

Trennung von Carotinoiden mit Hilfe der Hochdruck - Flüssigkeits - Chromatographie

von
Klaus Langer

aus
Kulmbach

1976 № 381

Trennung von Carotinoiden mit Hilfe der Hochdruck - Flüssigkeits - Chromatographie

**Den Naturwissenschaftlichen Fachbereichen
der Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg**

zur

Erlangung des Doktorgrades

vorgelegt

von

Klaus Langer

aus

Kulmbach

Als Dissertation genehmigt von den Naturwissenschaftlichen
Fachbereichen der Universität Erlangen-Nürnberg

Tag der mündlichen Prüfung: 21.3.1976

Vorsitzender der Promotionskommission:

Professor Dr. H. Remmert

Erstberichterstatter:

Professor Dr. G. Hesse

Zweitberichterstatter:

Professor Dr. K. Geibel



Herrn Akad. Dir. Dr. A. Haag
danke ich für die gebotene Möglichkeit,
seine Erkenntnisse über die
Hochdruck-Flüssigkeits-Chromatographie von Carotinoiden
als Grundlage dieser Arbeit zu verwenden
und für seine
unermüdliche Bereitschaft zur Diskussion.

Für seine großzügige finanzielle Unterstützung
bin ich Herrn Prof. Dr. G. Hesse
zu großem Dank verpflichtet.

Meinen Kollegen und Freunden
im Arbeitskreis
danke ich für die ausgezeichnete
Zusammenarbeit.

Den Herren H. Entian und H. Böller
gilt mein Dank
für ihre Hilfsbereitschaft bei der
Entwicklung und Fertigung von
apparativen Bauteilen.



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41543128_0004

Inhaltsverzeichnis

<u>Zusammenfassung</u>	Seite
1 <u>Einführung</u>	1
2 <u>Chemie der Carotinoide</u>	4
2.1 Struktur und Nomenklatur	4
2.2 Synthesewege	7
2.3 Physikalische Eigenschaften	9
2.4 Chemische Eigenschaften	12
3 <u>Klassische Analyseverfahren zur</u> <u>Carotinoid-Trennung</u>	16
3.1 Säulen-Chromatographie (SC)	17
3.2 Dünnschicht-Chromatographie (DC)	19
3.3 Papier-Chromatographie (PC)	23
3.4 Gas-Chromatographie (GC)	25
4 <u>Experimenteller Teil</u>	
4.1 Entwicklung der Hochdruck-Flüssigkeits- Chromatographie (HPLC)	27
4.2 Aufbau der Apparatur	28
4.2.1 Versorgungseinheit mit Dämpfungssystemen	28
4.2.2 Gradientenmischer	32
4.2.3 Probenaufgabesysteme	33
4.2.4 Trennsäule	34
4.2.5 Detektoren	36

5	<u>HPLC-Trennung von pflanzlichen, tierischen und synthetischen Carotinoiden</u>	38
5.1	Isolierung aus biologischem Material . . .	38
5.2	Behandlung der Proben	39
5.3	Identifizierungsmöglichkeiten für Carotinoide nach der Trennung mit HPLC	40
5.4	Schematische Darstellung des Analysenganges	43
5.5	"HPLC-Trennungen" von Carotinoiden an polaren Sorbenzien	43
5.6	Charakterisierung der "reversed-phase"- Technik	47
5.7	Diskussion der Parameter	50
5.8	Trennungen an "reversed-phase"-Systemen . .	53
5.8.1	Carotinoide von <i>Solanum lycopersicum</i> . . .	53
5.8.1.1	Trennung und Identifizierung der Carotinoide	54
5.8.1.2	Wiederholbarkeit der isokratischen Analyse	61
5.8.1.3	Möglichkeiten quantitativer Aussagen . . .	64
5.8.2	Carotinoide von <i>Spinacia oleracea</i>	68
5.8.2.1	Trennung und Identifizierung der Carotinoide	69
5.8.2.2	Untersuchung von Trennwirkung und Belast- barkeit an Säulen mit verschiedenen Innendurchmessern	80
5.8.2.3	Vergleich von verschiedenen "reversed-phase"- Sorbenzien	84
5.8.2.4	Wiederholbarkeit der Elutions-Gradient- Analysen	90
5.8.3	Herbstcarotinoide von <i>Acer platanoides</i> . .	93
5.8.3.1	Trennung und Identifizierung der Carotinoide	94

5.8.3.2	Untersuchung der Zersetzlichkeit von Carotinoiden bei der Analyse	98
5.8.4	Carotinoide von Capsicum annum	100
5.8.4.1	Trennung und Identifizierung der Carotinoide	101
5.8.4.2	Detektion bei verschiedenen Wellenlängen und Erfassungsgrenze	109
5.8.5	Carotinoide in Ei-Pulver	111
5.8.5.1	Trennung und Identifizierung der Pigmente	112
5.8.5.2	Nachweis von synthetischen Zusätzen	116
6	<u>Kritische Betrachtung der "reversed-phase"-HPLC Analyse</u>	119
	<u>Literaturverzeichnis</u>	123

1 Einführung

Die Geschichte der Entwicklung von Methoden zur Trennung von Pflanzenfarbstoffen - Chlorophyllen und Carotinoiden speziell - ist so alt wie die Geschichte der Chromatographie selbst. Das Interesse, der Natur dieser Stoffgruppe näherzukommen, rief diese Methode ins Leben und bestimmte ihre Entwicklung für die nächsten Jahrzehnte maßgeblich.

Der Weg der Chromatographie begann 1906 mit Arbeiten des Botanikers Michael Tswett, dem es erstmalig gelungen war, Carotinoide und Chlorophylle aufgrund unterschiedlicher Adsorptions-Eigenschaften zu trennen. In einer mit Calciumcarbonat gepackten Säule konnte er einen komplexen Pflanzenextrakt in mehrere einzelne Fraktionen aufteilen.⁽¹⁾ Auf seinen Erkenntnissen basieren die Erfolge, die sich R. Kuhn, A. Winterstein, E. Lederer⁽²⁾ und später L. Zechmeister⁽³⁾ in der Carotinoid-Forschung zu Anfang der 30er Jahre erworben haben. Sie erschlossen die präparative Dimension der Säulenchromatographie und verschafften eigentlich erst damit diesem Trennverfahren allgemeine Anerkennung.

Danach wurde die Anwendung der Chromatographie über den Bereich der Pflanzenfarbstoffe hinaus in der gesamten Chemie erweitert. Für immer neue Trennprobleme mußten Weiterentwicklungen erstellt werden. Papier-, Dünnschicht- und Gas-Chromatographie traten neben die klassische Säulenchromatographie. Die neueste Entwicklung in dieser Reihe

zu Beginn der 70er Jahre, die Hochdruck-Flüssigkeits-Chromatographie (HPLC), schließt wieder den Kreis zum Tswett-schen Chromatographierohr. Sie hat sich bereits Anerkennung durch ihre Anwendbarkeit in weiten Bereichen der Chemie erworben und soll nun in der vorliegenden Arbeit auch auf ihre Eignung zur Trennung von Carotinoiden untersucht werden.

Neben der Perfektionierung der Trenntechniken und deren Ausbreitung auf immer neue Teilbereiche der Chemie seit Beginn dieses Jahrhunderts ging eine Expansion der Carotinoid-Chemie in einem durchaus vergleichbaren Maßstab vor sich. Der Trennung und Identifizierung von Polyen-Pflanzenfarbstoffen folgten Erkenntnisse über Vitamin A - Aktivitäten, über in vivo- und in vitro-oxidative Umwandlungen und schließlich über gezielte Aufbausynthesen.

Nahezu gleichzeitig konnten Karrer und Eugster⁽⁴⁾ sowie Inhoffen⁽⁵⁾ das β -Carotin als ersten Vertreter dieser Stoffgruppe im Jahr 1950 mit einer Totalsynthese herstellen. Die nächsten Jahre brachten dann eine Fülle von Darstellungsmöglichkeiten vieler natürlicher Carotinoide.

Die präparative Entwicklung gipfelt inzwischen in der technischen Synthese der Pigmente β -Carotin, β -Apo-8'-carotinal, Canthaxanthin und Citranaxanthin, die alle als Nahrungsmittelfarbstoffe verwendet werden.

Durch die Fortschritte der analytischen Methoden ist es mittlerweile gelungen, mehr als 300 Carotinoide in natürlichen Vorkommen aufzuklären. Zoologie, Botanik und Mikrobiologie

werden durch die Vielfalt der Variationsmöglichkeiten in der Struktur dieser Substanzklasse vor ständig neue Probleme gestellt. Zudem erhöhen die oft minimalen Konzentrationen, in denen Carotinoide in natürlichen Produkten vorkommen, die Schwierigkeiten bei der Trennung und Identifizierung. Besonders die Aufklärung ihrer Biogenese und des Metabolismus im tierischen und pflanzlichen Organismus stellt größte Anforderungen an die Analytik.

Es ist selbstverständlich, daß man auf der anderen Seite auch bei den Carotinoid-Synthesen nicht ohne spezielle Trennmethoden auskommt. Präparative chromatographische Trennungen von Reaktionsgemischen sowie hochauflösende, zuverlässige Reinheitskontrollen gehören zur Routinearbeit. In der Regel greift der Synthetiker auf chromatographische Methoden zurück, die zunächst für biologische Problematiken entwickelt worden sind und dann für präparative Belange modifiziert werden müssen.

Mit der technischen Synthese von Carotinoiden (Hoffmann-La Roche & Co., AG, Basel; Badische Anilin - & Soda-Fabrik, Ludwigshafen) ergibt sich schließlich das neueste Betätigungsfeld für die Analytik von Carotinoiden insbesondere in der Qualitätskontrolle. Die Farbstoffe werden Nahrungsmitteln, wie z.B. Milchprodukten, Fruchtsäften und Backwaren bis zu einer vom Gesetzgeber festgelegten Höchstmenge (in den Vereinigten Staaten 7,5 mg/kg ⁽⁶⁾) beigemischt. Die Einhaltung dieser Vorschriften bedingt eine routine-

mäßig durchführbare Produktionskontrolle. Auch die Zumschung von Carotinoiden als Color-Additive zu Tierfutter etwa (z.B. zum Vertiefen der Eidotter-Farbe) macht rationelle und exakte Untersuchungsmethoden erforderlich.

Die Hochdruck-Flüssigkeits-Chromatographie ist nach den Erkenntnissen der vorliegenden Arbeit durchaus dazu geeignet, sowohl auf dem Gebiet der wissenschaftlichen Bioanalytik von Carotinoiden als auch auf dem präparativen und lebensmittelchemischen Anwendungsfeld viele bislang geübte klassische chromatographische Verfahren abzulösen. Ihre Vorzüge werden im einzelnen in Kapitel 6 diskutiert.

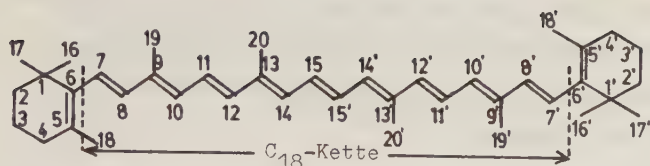
2 Chemie der Carotinoide

2.1 Struktur und Nomenklatur

Nach dem IUPAC-IUB-Versuchsregeln⁽⁷⁾ versteht man unter Carotinen ausschließlich Kohlenwasserstoffe, deren sauerstoffhaltige Derivate "Xanthophylle" genannt werden. Die beiden Gruppen sind der Verbindungsklasse der Carotinoide untergeordnet.

Ein im Prinzip gleicher systematischer Aufbau kennzeichnet die Struktur der Carotinoide. Sie leitet sich von einem Kohlenwasserstoff mit der Summenformel $C_{40}H_{56}$ ab, der sich aus acht Isopren-Einheiten zusammensetzt. Jedes C_{40} -Carotinoid besteht aus einer zentralen, verzweigten C_{13} -Kette, an deren beiden Enden sich je eine C_9 -Gruppierung

befindet.

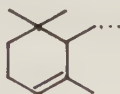


Während der zentrale C_{22} -Baustein nahezu aller C_{40} -Carotinoide identisch ist, unterscheiden sich die C_9 -Endgruppen beträchtlich und sie bewirken auch die Vielfalt, in der sich diese Pigmente in der Natur finden.

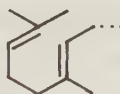
Man unterscheidet drei Grundtypen des C_9 -Bausteins und ordnet eine zu bestimmende Struktur entweder dem β -Typ, dem ϵ -Typ oder dem γ -Typ zu.



β -Typ

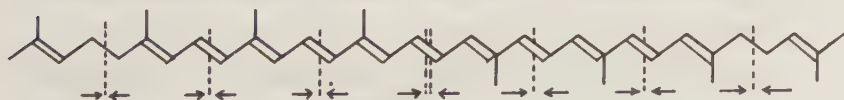


ϵ -Typ



γ -Typ

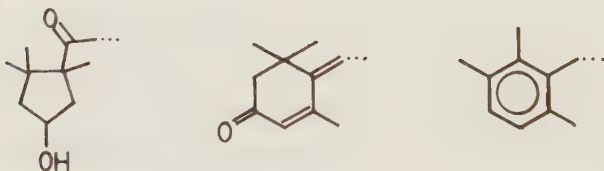
Das Lycopin (an beiden Enden γ -Typ) ist damit aus acht Isopren-Reinheiten aufgebaut, bei denen man zwei Vierergruppen unterscheiden kann, innerhalb derer die Isopren-Bausteine "Kopf-Schwanz"-verknüpft sind, während die beiden Vierergruppen miteinander durch eine "Schwanz-Schwanz"-Verknüpfung zusammengehalten werden.



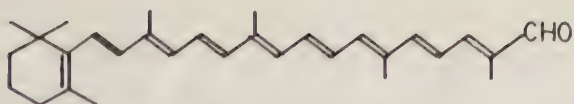
Jede der drei C_9 -Endgruppierungen kann zusätzlich eine oder mehrere unterschiedliche Sauerstoff-Funktionen aufweisen. Einige der häufigsten, natürlich vorkommenden Formen sind die folgenden:



Außerhalb dieser systematischen Zuordnung stehen Carotinoid-Strukturen, die endständig einen substituierten Cyclopentan-Ring wie beim Capsorubin, einen Cyclohexyliden-Ring wie beim Rhodoxanthin oder einen Phenylring wie beim Iso-renieratin aufweisen.



Schließlich sei noch auf natürlich vorkommende Carotinoide hingewiesen, die weniger als 40 C-Atome besitzen. Sie stammen in der Regel aus einem oxidativen Abbau der C_{40} -Carotinoide "in vivo" und tragen Aldehyd- und Carboxyl-Gruppen. Für die vorliegende Arbeit relevante Vertreter dieser Klasse sind das β -Apo-8'-carotinal und das Crocetin.



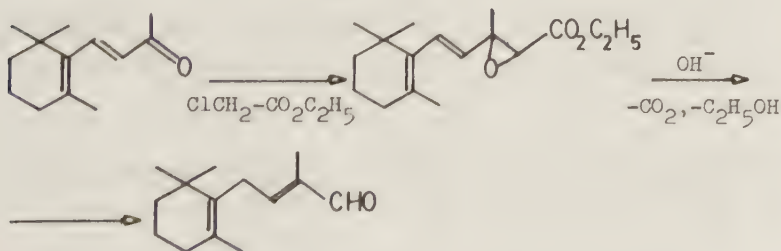
B-Apo-8'-carotinal



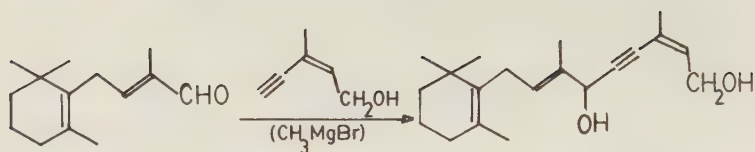
Crocetin

2.2 Synthesewege

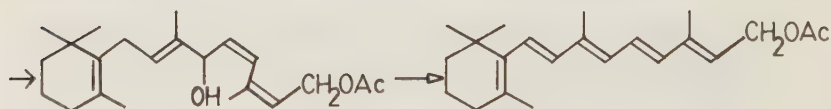
Seit 1950 sind viele Carotinoide auf den verschiedenartigsten Wegen synthetisiert worden⁽⁸⁾⁽⁹⁾. Einige davon führen über das Vitamin A, das von Isler et al.⁽¹⁰⁾ erstmalig in technischem Maßstab hergestellt wurde. Ausgehend vom B-Ionon gelangt man dabei vom C₁₃-Körper über eine Darzens-Glyzidestersynthese mit 80% Ausbeute zu einer Kettenverlängerung um ein C-Atom.



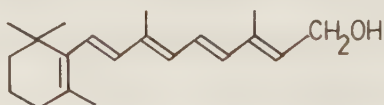
Durch Grignard-Reaktion mit cis-3-Methylpent-2-en-4-in-1-ol wird der B-C₁₄-Aldehyd in ein acetylenisches Diol überführt.



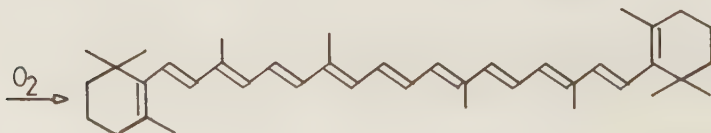
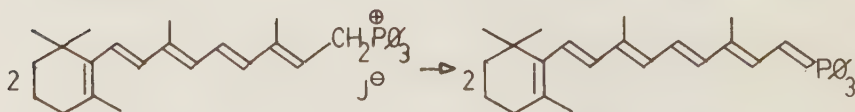
Die partielle Hydrierung am Lindlar-Katalysator und die Acetylierung der primären Hydroxylgruppe ermöglichen die Dehydratisierung und gleichzeitige Isomerisierung zum all-trans-Vitamin A-acetat.



Die Verseifung führt zum Vitamin A (Retinol).



Der C_{20} -Körper kann nun nach Überführung in das β -Retinyl-triphenylphosphoniumiodid zum entsprechenden Ylid umgewandelt werden,



das nach einer oxidativen Kopplung zweier Einheiten schließlich zur Totalsynthese des β -Carotins führt⁽¹¹⁾.

2.3 Physikalische Eigenschaften

Alle Carotinoide zeigen im sichtbaren Spektralbereich starke Absorptionen. Die geometrische Form des Absorptionsspektrums sowie die Lage der Maxima hängt von der speziellen Natur des Chromophors ab. Es liegt auf der Hand, daß die Interpretation der Absorptionseigenschaften gute Möglichkeiten bietet, bei unbekannten Proben auf das zugrundeliegende konjugierte System Rückschlüsse zu ziehen.

Im allgemeinen zeigen die Absorptionskurven von all-trans Carotinoiden drei diskrete Banden im Abstand von 20 - 40 nm, von denen die zentrale Bande gewöhnlich die intensivste ist. Das längerwellige Maximum ist weniger stark ausgeprägt. Das kürzerwellige kann oft nur als Flexur registriert werden.

Je länger sich die Polyenketten des Chromophors ausdehnt, nach umso längeren Wellenlängen wandern die Absorptionsbanden und die Farbe der Verbindungen vertieft sich von gelb nach rot. Gleichzeitig erhöht sich die Intensität der Absorptionsmaxima. Allgemein liegen bei azyklischen Kohlenwasserstoffen mit 7, 9, 11, 13 und 15 konjugierten Doppelbindungen die zentralen Absorptionsmaxima (in Hexan) bei 401, 440, 472, 500 und 510 nm und die ersten drei dieser Reihe weisen molare Extinktionskoeffizienten von 138 000, 161 000 und 186 000 auf⁽¹²⁾.

Carotinoide mit einem β -Ionon-Ring im Chromophor besitzen im Verhältnis zu den offenkettigen Verbindungen weniger ausgeprägte Feinstrukturen, verminderte Intensitäten und eine Verschiebung der Banden nach kürzeren Wellenlängen; eine Ring-Doppelbindung bewirkt lediglich ein Drittel des bathochromen Effektes einer offenkettigen. Die Ursachen dafür werden einer sterischen Hinderung der Ring-Methylgruppen mit den H-Atomen an C_7 und C_8 zugeschrieben, wodurch die Koplanarität und die s-trans-Orientierung der Ring-Doppelbindung mit der Kette erschwert wird, so daß die π -Orbitale nicht mehr maximal überlappen können.

Ferner können Verluste an ausgeprägter Feinstruktur bei erweiterter Ausdehnung des Chromophors im β -Ionon-Ring wie z.B. im Canthaxanthin (4,4'-Dioxo- β -Carotin) auftreten. Es ist dann lediglich noch ein einzelner breiter Peak zu beobachten.

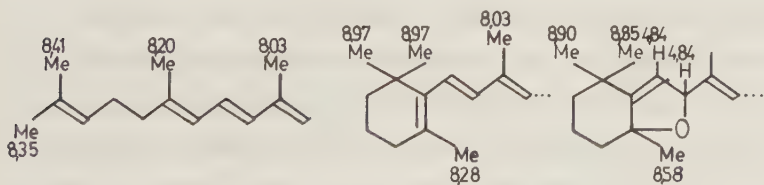
Die UV-Spektren aller Carotinoide sind vom Lösungsmittel abhängig. Die Lage der Absorptionsmaxima sinkt in Richtung kürzerer Wellenlängen innerhalb der Lösungsmittelreihe Schwefelkohlenstoff, Benzol, Chloroform, Äthanol und Hexan. Umgekehrt steigt der Wert der Extinktionskoeffizienten in der gleichen Reihe an.

Im Vergleich zu cis-Isomeren absorbiert die all-trans Form eines Carotinoids bei größeren Wellenlängen; sie hat einen höheren Extinktionskoeffizienten und das Spektrum zeigt eine ausgeprägtere Feinstruktur. Viele UV-Spektren von cis-Formen enthalten einen sogenannten "cis-Peak", der bei ei-

ner um 142 ± 2 nm kürzeren Wellenlänge als die Bande mit dem längstwelligen Absorptionsmaximum liegt⁽¹³⁾. Der cis-Peak ist im allgemeinen von geringer Intensität.

Im IR-Spektrum zeigen Carotinoide eine starke Bande bei 964 cm^{-1} (C-H "out of plane"-Deformationsschwingung der trans CH=CH-Gruppierung). Daneben können spezielle Bandenlagen über central-cis Komponenten, über acetylenische, allenische, Hydroxy- und Keto-Gruppierungen Auskunft geben⁽¹⁴⁾. Generell ist jedoch die IR-Spektroskopie in der Carotinoid-Analytik von untergeordneter Bedeutung.

Größeren Informationsgehalt liefern NMR-Spektren. Sie tragen besonders zur Aufklärung von Struktur und Stereochemie neuer, unbekannter Verbindungen bei. Einige typische chemische Verschiebungen sind Ketten-, Kettenend- und Ring-Methyl-Gruppen, furanoiden Ringprotonen, Methoxy- und Aldehyd-Funktionen zuzuordnen; sie müssen im Einzelfall bestimmt bzw. den Werten aus bestehenden Tabellenwerken zugeordnet werden⁽¹⁵⁾.

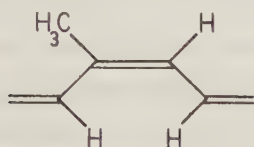


In der Massenspektrometrie war die erste zuverlässige Methode zur Bestimmung der Molekulargewichte von Carotinoiden gegeben. Sie erkennt darüber hinaus u.a. OH-Gruppen (M-18, M-2x18), Acetat-Funktionen (M-60) usw.. Charakteristisch für die meisten Carotinoide ist der (M-106) Peak, der durch die Abspaltung von C_8H_{10} (Xylol) aus der Polyen-Kette entsteht. Das Fragmentierungsmuster gibt allgemeine Hinweise auf die Grobstruktur des Moleküls; einige spezielle Massenzahlen sind charakteristisch für besondere Struktureinheiten. Auch bei dieser Methode gibt es inzwischen Möglichkeiten, sich an Tabellenwerken und Review-Artikeln zu orientieren⁽¹⁶⁾⁽¹⁷⁾.

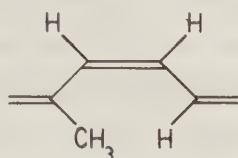
2.4 Chemische Eigenschaften

Die große Zahl von Doppelbindungen in den Carotinoiden eröffnet eine Unzahl von Reaktionsmöglichkeiten. Besondere Bedeutung besitzen Oxidationen und cis-trans-Isomerisierungen. Meistens sind diese Vorgänge unerwünscht und verwandeln im Lauf der Zeit hochgereinigte Produkte in undefinierbare, teilweise oxidierte Isomeren-Gemische. Es gibt aber auch Möglichkeiten, solche Reaktionen gezielt als Darstellungsweg für neue Carotinoide zu nutzen. Mühevollere Aufbau-Reaktionen bleiben dabei erspart, es werden jedoch große Anforderungen an Trenntechniken besonders bezüglich neu entstandener Isomeren-Gemische gestellt. Für β -Carotin, α -Carotin und Lycopin gibt es theoretisch 272, 512 und 1056 Iso-

merisierungsmöglichkeiten der azyklischen Doppelbindungen. Schließt man die Bildung von sterisch gehinderten cis-Produkten aus, so bleiben in derselben Reihe immerhin noch 20, 32 und 72 Möglichkeiten⁽¹⁸⁾.



ungehindert



gehindert

Um all-trans Carotinoide in eine Mischung von Stereoisomeren zu überführen, stehen mehrere Methoden zur Wahl:

- 1) Katalyse mit Jod und gleichzeitige Belichtung;
- 2) Erhitzen in einem Kohlenwasserstoff-Lösungsmittel im Dunkeln;
- 3) Kontakt mit aktiven Oberflächen (z.B. akt. Al_2O_3);
- 4) Bestrahlen mit ultravioletttem Licht;
- 5) Säurekatalyse;
- 6) Kristallschmelze im Vakuum.

Die gebräuchlichste Methode ist die zuerst genannte. Man verwendet dabei meistens eine in Bezug auf das Carotinoid 1 %-ige Lösung von Jod in Benzol. Die neu entstandenen Isomeren werden gewöhnlich nach ihrem chromatographischen Verhalten benannt: Pigmente, die stärker als die ursprüngliche all-trans Form zurückgehalten werden, bekommen als Praefix Neo T, U, V; solche die aus der Säule früher eluiert werden, sind die Neo A-, B-, C-Isomeren⁽¹⁹⁾.

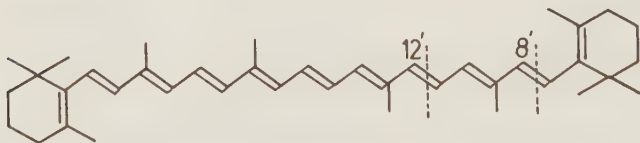
Bedeutsam dabei ist, daß nach der Jod-Katalyse, gleichgül-

tig welches Stereoisomere als Startmaterial benützt worden ist, das Isomerengemisch am Ende der Reaktion identisch ist. Eine Ausnahme von dieser "Gleichgewichts-Regel" bilden lediglich einige poly-cis Isomere des Lycopins.

Kriterien zur Zuordnung der cis-Isomeren bilden neben dem chromatographischen Verhalten vor allem die Absorptionsspektren mit dem cis-Peak und der Verlagerung der Maxima nach kürzeren Wellenlängen hin.

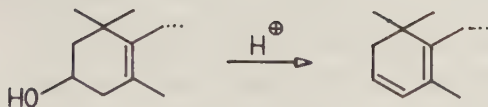
Für Carotinoid-Oxidationen verwendet man als Reagenzien Kalium-Permanganat⁽²⁰⁾, Chromsäure⁽²¹⁾, Wasserstoffperoxid zusammen mit Osmiumtetroxid⁽²²⁾, Persäuren⁽²³⁾ und das Dehydrierungsmittel N-Bromsuccinimid⁽²⁴⁾.

Aus β -Carotin ist so z.B. durch Behandeln mit alkalischem Permanganat eine Spaltung der Polyenkette an den Positionen 8 und 12 bzw. 8' und 12' zu erreichen.



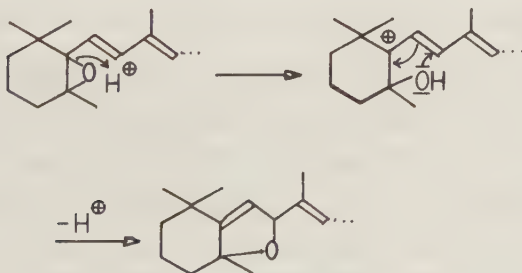
Man erhält die beiden Aldehyde β -Apo-3'-carotinal und β -Apo-12'-carotinal.

Carotinoide mit allylständigen Hydroxyl-Gruppen erfahren mit trockenem HCl in alkoholfreiem Chloroform eine Dehydatisierung und damit eine Verlängerung der Konjugation. Farbvertiefung ist die Folge⁽²⁵⁾.



Die Zugabe des HCl/CHCl_3 -Reagens' zu einer methanolischen Lösung von Carotinoiden mit allyl-ständigem Hydroxyl führt zu dessen Methylierung⁽²⁶⁾. Durch Behandlung mit Mangandioxid bekommt man die Oxidation zum entsprechenden Keton⁽²⁷⁾.

Eine charakteristische Reaktion unter der Einwirkung von Säuren ist die Umlagerung von Carotinoid-5,6-Epoxiden in eine furanoide Form⁽²⁸⁾ (manchmal fälschlicherweise 5,8-Epoxid genannt). Dem wird folgender Mechanismus zugrunde gelegt:



Diese Reaktion ist von einer Verschiebung der Absorptions-Maxima um 20-25 nm je umgelagerter Epoxid-Gruppe nach kürzeren Wellenlängen hin begleitet. Sie sollte damit eine gute

Erkennungsmöglichkeit für das Vorhandensein solcher Strukturmerkmale darstellen. In der Praxis ist die Aussagekraft jedoch beschränkt; sie wird später eingehender diskutiert.

Auch einige der vielfältigen speziellen Reaktionen, die man im Einzelfall zur Erkennung von Struktureinheiten heranziehen kann, werden erst bei der Beschreibung der chromatographischen Trennmethode angeführt. Für Dünnschicht- und Papier-Chromatographie sind diese Möglichkeiten größtenteils anders als bei der klassischen und der modernen Säulen-Chromatographie. Das ist zum einen auf die Nachweismöglichkeiten bei der jeweiligen Trenntechnik zurückzuführen, zum anderen auf die unterschiedlichen Substanzmengen, die dabei maximal eingesetzt werden können.

3 Klassische Analysenverfahren zur Carotinoid-Trennung

Die Chromatographie hat sich, wie schon eingangs erwähnt, zur gebräuchlichsten Methode für die Trennung, Reinigung und Isolierung von Carotinoiden entwickelt. Entscheidend dafür ist die Tatsache, daß die Sorptionsfähigkeit der Polychromophore schon durch sehr geringfügige Unterschiede im Molekülbau relativ stark beeinflußt wird und daß sich daher meist auch sehr nahe verwandte Pigmente im jeweiligen chromatographischen System voneinander trennen lassen. Bereits Tswett hat erkannt, daß die Stärke der Adsorption von drei Variablen abhängt: von der Substanz selbst, die adsorbiert wird, vom Lö-

sungsmittel und vom Adsorbens. Heute faßt man diese Variablen im Begriff "Adsorptionsmilieu" zusammen.

Dem Analytiker standen vor der Entwicklung der HPLC im wesentlichen vier chromatographische Techniken zur Wahl, bei denen er jeweils diese Parameter zueinander optimieren mußte: Säulen-, Dünnschicht-, Papier- und, von untergeordneter Bedeutung, die Gas-Chromatographie.

3.1 Säulen-Chromatographie (SC)

Seit den ersten Arbeiten von Tswett über die Säulen-Chromatographie von Carotinoiden wurden viele Variationen im Sorbens, im Eluens und in speziellen Durchführungsformen beschrieben, um eine möglichst vollkommene Trennung der Pigmente zu erreichen. Drei Ausführungsformen der Säulen-Chromatographie fanden dabei besondere Verwendung: die sogenannte Zonen-Chromatographie, die stufenweise Elutions-Chromatographie und die Gradient-Elutions-Chromatographie⁽²⁹⁾⁽³⁰⁾.

Bei der Zonen-Chromatographie wird das Carotinoid-Gemisch in einem unpolaren Lösungsmittel auf den Säulenkopf aufgegeben. Je nach den Eigenschaften der betreffenden Carotinoide versucht man dann mit einem geeigneten, polareren Solvens das Pigment-Gemisch über die ganze Länge der Säule in Zonen aufzutrennen, die man herausschneiden und mit einem polaren Lösungsmittel eluieren kann. Zur stufenweisen Elutions-Chromatographie erfolgt die Probenaufgabe analog, jedoch wird das Chromatogramm mit Solvenzien schrittweise ansteigender Polari-

tät entwickelt. Das hat die Elution der Pigmente aus der Säule in der Reihenfolge ihrer Polarität zur Folge. Wird die Polarität des Elutionsmittels nicht schrittweise, sondern kontinuierlich erhöht, so lassen sich schärfere Banden und damit eine bessere Trennleistung erreichen. Dies ist das Kennzeichen der Gradient-Elutions-Chromatographie. Die Charakteristik des Gradienten, d.h. der Anstieg der Polarität pro Zeit-Einheit, muß immer in Bezug auf das gewählte Sorbens und die zu trennende Probe hin optimiert werden.

Als Adsorbentien für die Carotinoide sind in der Literatur eine Fülle von verschiedenen Materialien beschrieben. Waren mit den Sorbentien, die noch aus der "Pionierzeit" der Carotinoid-Chromatographie stammen (Aluminiumoxid, Fasersetonerde, Calciumcarbonat, Erdalkalioxide und verschiedene Zucker), bereits beachtliche Trennleistungen vor allem bei den Xanthophyllen gelungen, so ermöglichte die von P. Karrer⁽³¹⁾ 1933 eingeführte Kalk-Chromatographie erstmals eine einwandfreie Abtrennung des α -Carotins. Dasselbe gelang H.H. Strain 1934⁽³²⁾ mit einem 1:1-Gemisch aus Magnesiumoxid und dem Kieselguhr Hyflo-Super Cel (Johns-Manville, USA). Dieses Sorbens wird bis heute vielfach als Trennmittel besonders für die unpolareren Vertreter der Carotinoide verwendet. Zur Vorreinigung von Extrakten wählt man zweckmäßigerweise Aluminiumoxid, das die Grobauftrennung der Carotine und Xanthophylle gewährleistet. Es ist zu beachten, daß Aluminiumoxid, Calciumcarbonat und Kalk die Bildung von Stereoisomeren insbesondere beim Passieren von all-trans Carotinen durch die Säule bewirken

können. Dagegen erweist sich MgO praktisch ohne einen derartigen Einfluß auf die Zusammensetzung der zu trennenden Proben⁽³³⁾⁽³⁴⁾⁽³⁵⁾.

Die Elutionsreihenfolge von Carotinoiden wurde in mehreren Monographien dokumentiert⁽³⁶⁾⁽³⁷⁾⁽³⁸⁾. Sie kann bei unterschiedlichen Sorbenzien leicht variieren. Im allgemeinen werden azyklische Komponenten stärker sorbiert als zyklische, längerkettige stärker als kürzerkettige, und trans-Isomere wandern langsamer als cis-Isomere.

Als Eluenten finden nahezu alle gebräuchlichen Lösungsmittel Verwendung. Lediglich die Benützung von Chloroform und anderen halogenierten Kohlenwasserstoffen sollte vermieden werden wegen Isomerisierungs-Effekten, die bereits mit Spuren von Salzsäure eintreten können.

3.2 Dünnschicht-Chromatographie (DC)

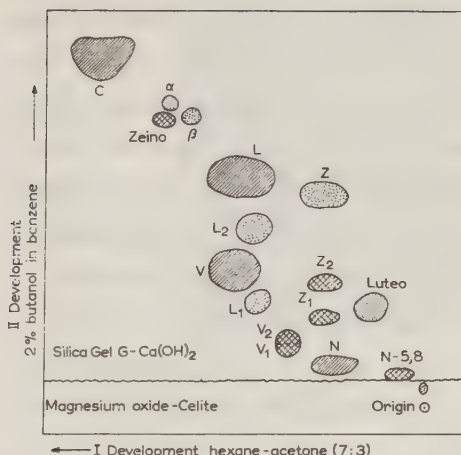
Besteht die Hauptverwendung der Säulen-Chromatographie besonders darin, komplexe Pigment-Extrakte grob aufzutrennen und aus Gemischen größere Mengen an Substanzen (mg -g-Bereich) in einem Arbeitsgang rein zu gewinnen, so liegen die Vorzüge der Dünnschicht-Chromatographie demgegenüber darin, daß vor allem kleine Substanzmengen gehandhabt werden können. Die Methode erfordert bei Carotinoid-Trennungen einige Vorsichtsmaßnahmen, da die Polyene auf der Plattenoberfläche in erhöhtem Maße der Luftoxidation und Isomerisierungen durch Licht ausgesetzt sind. Man kann diese Effekte vermeiden durch

Arbeiten im Dunkeln und unter Schutzgasen (N_2 , CO_2)⁽³⁹⁾. Auch die Zumischung von Ascorbinsäure zur Trennschicht als Antioxidans nach A. Hager und T. Meyer-Bertenrath⁽⁴⁰⁾ soll als Schutzmaßnahme wirksam sein. Stets muß peinlich vermieden werden, daß die DC-Platten nach der Analyse trocknen, sofern man die getrennten Zonen isolieren will. Besonders bei Kieselgel tritt dann sofort Zersetzung der Proben ein.

In Bezug auf die wirksamen Trennmechanismen unterscheidet man zwei für die Praxis der DC-Carotinoid-Analyse etwa gleich bedeutende Verfahren: das adsorptionschromatographische zum einen und das verteilungschromatographische zum andern.

Für die adsorptionschromatographische Pigmenttrennung ist in der Literatur eine ganze Reihe von Trennsystemen beschrieben⁽⁴¹⁾⁽⁴²⁾. Gut geeignet für Xanthophyll-Trennungen sollen Kieselgel G-Platten mit 15% Methanol in Benzol als Fließmittel sein. Für Carotine eignet sich besser die Al_2O_3 -Schicht, wenn sie mit unterschiedlichen Anteilen von Benzol in Petroläther entwickelt wird. Eine gleichzeitige und auch noch etwa gleich gute Trennung von mehreren polaren und unpolaren Komponenten auf einer Platte in einem Analysenlauf ist jedoch noch nicht gelungen. Das sprengt sicherlich auch die Möglichkeiten der klassischen Dünnschicht-Chromatographie. Die bisher wohl weiteste Entwicklung, die mit dieser Methode erreicht worden ist, zeigt das Chromatogramm in Abb. 1⁽⁴³⁾.

Abbildung 1:



Two-dimensional, two-adsorbent TLC of a carotenoid mixture on a magnesium oxide-Celite + Silica Gel G- $\text{Ca}(\text{OH})_2$ plate. C = Carotenes, α = α -cryptoxanthin, β = β -cryptoxanthin, Zeino = zeinoxanthin, L = lutein, Z = zeaxanthin, L_1 and L_3 = lutein *cis* isomers (corresponding to "neo-A" or "V" and "neo-B" or "U", respectively), V = violaxanthin, V_1 and V_3 = violaxanthin *cis* isomers, Z_1 and Z_3 = zeaxanthin *cis* isomers, Luteo = luteoxanthin, N = neoxanthin, N-5,8 = neoxanthin 5,8-epoxide.

Es wurde in zweidimensionaler Arbeitstechnik auf zwei verschiedenen Schichten erstellt und ist damit für breitere Anwendungen sicher zu kompliziert.

Im allgemeinen erhält man bei der Adsorptions-DC breite, zum Teil verwaschene Flecke bzw. Banden, was oft auf die Abhängigkeit der Wanderungsgeschwindigkeit eines Farbstoffes von seiner Konzentration und auf Inhomogenitäten von dessen Verteilung innerhalb der Trennschicht zurückzuführen ist. Schärfere Trennungen erhält man meistens bei Anwendung des verteilungs-chromatographischen Prinzips.

Dabei arbeitet man in der Regel mit Kieselgel-Platten, die mit einer Lösung von pflanzlichen Ölen in Petroläther be-

sprüht und so imprägniert worden sind⁽⁴⁴⁾. Trennungen dieser Art erfolgen nach dem "reversed-phase"-Prinzip, das in modifizierter Form auch bei den HPLC-Analysen dieser Arbeit verwendet worden ist. Die Elutionsreihenfolge ist dabei im Vergleich zu der Adsorptionsmethode in der Regel auf den Kopf gestellt, d.h. Xanthophylle wandern hier schneller als Carotine. Es sind auch verteilungschromatographische Trennungen von Carotinoiden an nicht imprägnierten Platten beschrieben⁽⁴⁵⁾. Die Verteilungsgleichgewichte spielen sich dabei in Fließmittelgemischen ab, die sich aus einer apolaren und einer polareren Phase aufbauen. Diese beiden Phasen erfahren auf der Schicht eine teilweise Entmischung und bewirken die Trennung der Komponenten im Sinne von wiederholten Ausschüttelprozessen. Abb. 2 zeigt die Auftrennung von Chloroplasten-Pigmenten nach dieser Methode⁽⁴⁵⁾.

Da die Carotinoide von Natur aus stark gefärbt sind, erübrigt sich bei der Dünnschicht-Chromatographie meistens die Benützung von Spezial-Reagenzien zur Detektion. Zum Nachweis von Pigment-Spuren dient ein Antimontrichlorid/Chloroform-Spray, oder man setzt die entwickelten Platten Jod-Dämpfen aus, wobei sich die Polyene dunkel anfärben lassen. Die Erfassungsgrenze kann damit auf ca. 0,05 µg des Pigmentes reduziert werden.

Abbildung 2:



Verteilungschromatographische Auftrennung der Pigmente von *Chlorella pyrenoidosa* (Stamm München, Nr. 10) an einer Dünnschicht, bestehend aus einer Kieselgel-Kieselgur-Mischung.
1 α -Carotin + β -Carotin, 2 Chlorophyll a, 3 Chlorophyll b, 4 Lutein + Zeaxanthin,
5 Antheraxanthin + Lutein-5,6-Epoxyd, 6 Violaxanthin, 7 Neoxanthin, 8 Startlinie

Zur quantitativen Bestimmung eignen sich der Vergleich mit einer mitgeführten Standardreihe und direkte Bestimmung der Absorptionen auf der Platte, oder das Abschaben der Flecken sofort nach der Trennung, Eluieren und Abzentrifugieren des Sorptionsmittels mit anschließender spektrophotometrischer Vermessung. Jeder Arbeitsgang birgt aber einige nicht unerhebliche Fehlerquellen in sich.

3.3 Papier-Chromatographie (PC)

Die Papier-Chromatographie ist das älteste chromatographische Verfahren mit rein analytischer Zielsetzung. Sie ist mit der DC nahe verwandt und führt ihre Trennwirkung hauptsächlich auf Verteilungsmechanismen zwischen wasserfeuchten Cellulose-Geweben und mit Wasser nicht mischbaren Fließmitteln zurück.

Die inzwischen große Zahl von Carotinoid-Trennungen mit unterschiedlichsten Papieren (Whatman, Schleicher & Schüll) ist bei Z. Sesták⁽⁴⁶⁾ zusammengefaßt. In neuesten Publikationen wird besonders der erfolgreiche Einsatz von Papieren beschrieben, die mit Kieselgel bzw. Aluminiumoxid gefüllt sind⁽⁴⁷⁾⁽⁴⁸⁾ und damit zunehmend adsorptionschromatographische Anteile in die wirksamen Trennmechanismen einbringen. Als Fließmittel dient dabei Hexan mit wechselnden Anteilen von Aceton.

Die Pigment-Chromatogramme werden zumeist in der Circular-Technik entwickelt. Diese hat den prinzipiellen Vorteil gegenüber dem eindimensionalen Lauf, daß sich die Banden vom Auftragungsort in radialer Richtung hin selbst verschärfen, und daß man die Analyse durch Zentrifugation (450-750 Umdrehungen/min) noch erheblich beschleunigen kann. Das kommt der schonenden Behandlung dieser zersetzlichen Substanzen sehr entgegen. Ein großer Nachteil der Circular-Chromatographie besteht darin, daß Pigmente, die nur in kleinen Konzentrationen vorliegen, kaum mehr erkannt werden können. Zudem ist die Auswahl der Fließmittel generell bei der PC im Vergleich zur DC stark eingeschränkt. Die quantitative Behandlung der Proben ist der DC analog.

3.4 Gas-Chromatographie (GC)

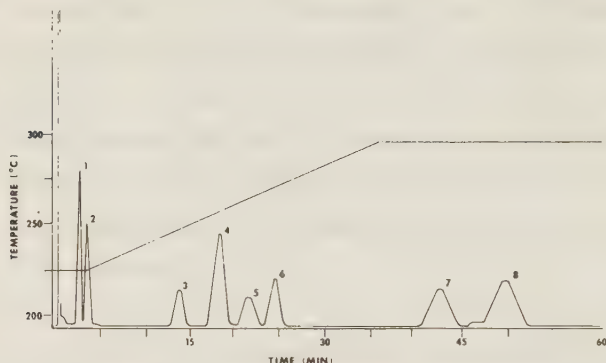
Die Trennungen von einigen Carotinoiden mit Hilfe der Gas-Chromatographie, die kürzlich gelungen sind, haben sicherlich für die Bedeutung der Analytik dieser Naturstoffe wenig Gewicht. Sie sind eher sichtbares Zeichen dafür, welche große Anstrengungen in den letzten Jahren unternommen worden sind, gaschromatographisch auch Substanzen zu erfassen, die von vornherein keinerlei Eignung für diese Methodik zeigen. Gerade die leichte Zersetzlichkeit und mangelnde Verdampfbarkeit der Carotinoide stehen in diametralem Gegensatz zu den drastischen Analysenbedingungen der GC. Es ist unerlässlich, die Pigmente vor der Analyse chemisch so umzuwandeln, daß sie ausreichend flüchtig werden.

R.F. Taylor et al.⁽⁴⁹⁾⁽⁵⁰⁾ unterwerfen zunächst alle Carotinoide einer katalytischen Hydrierung, um zu den Perhydro-Produkten zu kommen. Mit Sicherheit ist das verwendete Platinoxid nicht nur für die Hydrierung katalytisch wirksam, sondern begünstigt Zersetzungen der Pigmente. Eigene Erfahrungen mit Silbernitrat bestätigen das.

Hydrierte Xanthophylle müssen zudem noch entweder mit Acetanhydrid acetyliert oder mit Hexamethyldisilazan silyliert werden. Diese Reaktionen sind für Reinsubstanzen wohl anwendbar, komplexe Extrakte würden diese Behandlungen nicht ohne gravierende Veränderungen überstehen. Abb. 3 zeigt die Trennung eines zusammengestellten Gemisches ausgewählter Reinsubstanzen an einer unpolaren Säule (Dow-Corning).

Hochvakuum-Fett auf Chromosorb W, 80-100 mesh)⁴⁹⁾.

Abbildung 3:



1. Programmed gas chromatographic separation of mixture of native and hydrogenated carotenoid and carotenoid-like compounds: (1) H_2 -phytol; (2) H_2 -retinol; (3) echinenone; (4) H_2 -squalene; (5) H_2 - β -apo-8'-carotenal; (6) squalene; (7) H_2 -lycopene; (8) H_2 - β -carotene.

Die Carotinoid-Trennungen, die mit der GC erzielt worden sind, bleiben wohl nur von theoretischer Bedeutung. Sie weisen deutlich auf die Grenzen hin, die dieser Methode auferlegt sind.

Betrachtet man die Vorteile, die die Gas-Chromatographie für viele andere Substanzklassen in sich birgt - hochauflösende Trennungen, kurze Analysenzeiten, nahezu unbegrenzte Wiederholbarkeit der Analyse am selben Trennsystem, niedrige Erfassungsgrenzen - und vergleicht dazu die Vorzüge der klassischen Säulen-Chromatographie - schonende Behandlung der Proben, Möglichkeiten präparativer Analysen - so drängt sich für Carotinoid-Trennungen fast zwangsläufig die Hochdruck-Flüssigkeits-Chromatographie als die Methode der Wahl auf, die all diese Vorzüge in sich vereinigt. Sie wird

in der nächsten Zeit die Entwicklung auf diesem Gebiet maßgeblich bestimmen.

Experimenteller Teil

4.1 Entwicklung der Hochdruck-Flüssigkeits-Chromatographie (HPLC)

Bereits 1941 sagten Martin und Synge⁽⁵¹⁾ voraus, daß mit der Säulen-Flüssigkeits-Chromatographie die besten Trennleistungen zu erhalten sind bei der Verwendung von sehr kleinen Teilchen und hohem Druck-Abfall entlang der Säule. Die Gas-Chromatographie konnte kleine Teilchen (50-100 μm) ohne größeren technischen Aufwand wegen der 100-fach geringeren Viskosität der Gase gegenüber Flüssigkeiten weit früher einsetzen. Sie war in apparativer Hinsicht bis zu den ersten Ansätzen der HPLC bereits zu einer nahezu perfekten Methode gereift.

Seit Ende der 60-er Jahre ist man dabei, mit ständig neuen technischen Entwicklungen bei der Flüssigkeits-Chromatographie diesen Vorsprung zu verringern.

Inzwischen sind eine Reihe von modernen Flüssig-Chromatographen kommerziell erhältlich, die mit Maximal-Drucken bis zu 500 bar bei guten Fördervolumina für Hochleistungs-Säulen verwendet werden können. Trennsäulen unterschiedlichster Art werden mit kleinsten Teilchen (bis herab zu

5 μm Partikeldurchmesser) fertig gepackt angeboten. Zur Proben-Detektion sind Geräte entwickelt worden, die auf der Basis von Photometrie, Refraktometrie, Fluoreszenz-Spektroskopie usw. Substanzmengen bis in den Bereich von Femtogramm (10^{-14}g) im Durchfluß nachweisen können.

Es erweist sich als sinnvoll, den Aufbau bzw. die Zusammensetzung einer HPLC-Apparatur speziell auf den beabsichtigten Verwendungszweck hin abzustimmen. Universelle Einsetzbarkeit ist meist nur auf Kosten geeigneter spezieller Vorbehandlungs- oder Nachweisverfahren der Proben zu erreichen.

Das Gerät, das in der vorliegenden Arbeit für die Carotinoid-Trennungen verwendet wurde, ist in allen Teilen selbst zusammengestellt worden.

4.2 Aufbau der Apparatur

Der Aufbau des eingesetzten Gerätes ist schematisch in Abb. 4 skizziert und beinhaltet folgende Komponenten: Elutionsmittel-Vorratsgefäße, Pumpe, Dämpfungssystem, Gradientenmischer, Probeaufgabesystem, Trennsäule und Detektoren.

4.2.1 Versorgungseinheit mit Dämpfungssystemen

Die Versorgungseinheit enthält den Vorrat an mobiler Phase und Einrichtungen zur Erzeugung und Überwachung des Eluentstromes. Der Lösungsmittel-Vorrat ist in zwei Gefäßen unter-

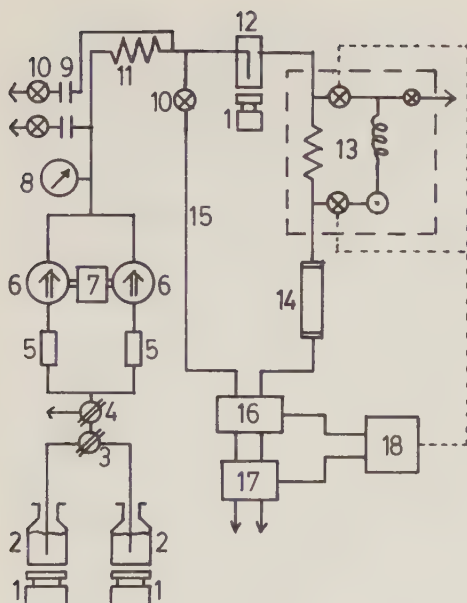


Abbildung 4:

- 1 Magnetrührer
- 2 Elutionsmittelvorratsgefäße
- 3 Dreiwegehahn
- 4 Saug-Ventil (Fa. Whitey; Kontron, München)
- 5 Filter (Fa. Nupro; Kontron München)
- 6 Pumpenkopf
- 7 Pumpen-Antriebsmotor
- 8 Manometer (Fa. WIKA, Klingenberg)
- 9 Dämpfer
- 10 Nadelventil (Fa. Hoke, Frankfurt/Main)
- 11 Restriktions-Dämpfer
- 12 Gradienten-Mischer
- 13 Injektionssystem
- 14 Säule
- 15 Referenz-Leitung
- 16 Spektralphotometer
- 17 Differential-Refraktometer
- 18 Schreiber

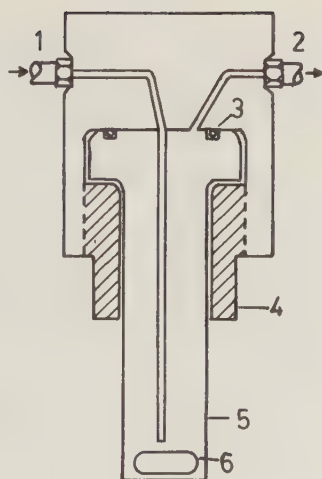


Abbildung 5:

- 1 Einlaß
- 2 Auslaß
- 3 Teflon - O-Ring
- 4 Andruckschraube
- 5 Mischkammer
- 6 Magnetrührer

gebracht (Eluens A und B bei Gradienten-Analysen), die mit einem Rührwerk ausgestattet sind. Rühren ist aus zwei Gründen notwendig: einmal um die bei Zimmertemperatur im Eluens gelöste Luft auszutreiben und so sicherzustellen, daß im Detektor nach der Entspannung der Flüssigkeit keine Gasblasen auftreten, zum andern um bei Verwendung von Lösungsmittelgemischen das Eluens in homogener Mischung zu halten. Vor Beginn einer Analyse wurde die mobile Phase noch zusätzlich durch kurzes Anlegen von Vakuum entgast. Die organischen Lösungsmittel (Merck, Darmstadt; Baker, Deventer, Holland), welche für die Elutionsmittelgemische verwendet wurden, hatten die Qualität "pro synth." und sind nicht weiter vorgereinigt oder absolutiert worden. Wahlweise können die Fließmittel A oder B über einen Dreiwege-Hahn und ein Saugventil vor die Pumpenköpfe geschleust werden. In diesen Weg sind zwei Edelstahl-Fritten geschaltet (Porengröße 60 μm), die die Pumpenventile vor Verschmutzung schützen. Die porösen Frittenkörper müssen in regelmäßigen Abständen mit einer Reinigungs-Lauge (z.B. Extran, Merck) behandelt werden, da es bei Absinken des Pumpenvordruckes infolge verminderter Durchlässigkeit der Fritten zu beträchtlichen Schwankungen im Hochdruck-Teil kommt. Aus dem gleichen Grund sind für die Zuleitung Schläuche mit einem Durchmesser größer als 1 mm zu wählen.

Als Fördereinrichtung diente eine zweiköpfige Doppelkolben-Membranpumpe (Fa. Orlita, Gießen, Typ DMP-SK 15/3). Die Fördergenauigkeit beträgt 0,1%, der Nenndruck 325 bar, die maximale Fördermenge 1120 ml/h. Daneben wurde eine

mediumberührte Kolbenpumpe (Fa. Knauer, Oberursel/Ts.) erprobt, die ebenfalls zweiköpfig ausgelegt war. Sie sollte laut Herstellerangabe durch elektronische Steuerung der Kolbenbewegungen eine pulsfreie Förderung der mobilen Phase gewährleisten. In der Praxis erwies sie sich jedoch wegen großer Reparaturanfälligkeit als ungeeignet. Es zeigt sich, daß Kolbenmembranpumpen der Vorzug zu geben ist, da bei ihnen die mit dem Eluens in Berührung kommenden Teile leicht aus hochresistenten Materialien hergestellt werden können.

Die Pulsation des Flusses wurde mit einer Dämpfungskette (Fa. Waters Meßtechnik GmbH, Königstein/Ts.) geglättet. Die einzelnen Glieder setzten sich aus hintereinandergeschalteten hydraulischen Kapazitäten und Widerständen (Kapillaren und volumenelastische Behälter) zusammen. Sie reduzieren die Pulsationsschwankungen auf $< 1\%$ Restpulsation. Eine Dämpfungsvorrichtung, die im Nebenast eingebaut werden kann und die gleichzeitig auch als Sicherheitsventil dient, wurde nach Vorschriften von I. Halašz et al.⁽⁵²⁾ gebaut und eingesetzt. Sie erreicht durch Gleichgewichtseinstellung der mobilen Phase mit einem konstanten äußeren Gasdruck über eine bewegliche Membran gleich gute Glättungseigenschaften wie das oben beschriebene System. Es sind dabei jedoch größere Flußraten erforderlich, da bei der Dämpfung der Druckspitzen ständig Lösungsmittel austritt. Für Pumpen mit geringer Förderkapazität ist dieser Bauteil deshalb weniger geeignet. Bei der Benützung der Dämpfungskette ist

zusätzlich eine Sicherheits-Vorrichtung erforderlich, die die Pumpe vor Druck-Überlastung schützt. Diesen Zweck erfüllte in der beschriebenen Apparatur ein Manometer mit Grenzdruck-Kontaktschalter, der den Pumpenmotor bei einem eingestellten Maximaldruck automatisch stoppt.

4.2.2 Gradientenmischer

Für die reproduzierbare hochdruckseitige Mischung von Gradienten eignet sich vorzüglich eine von E.H. Pfadenhauer et al.⁽⁵³⁾ beschriebene Hochdruck-Gradienten-Kammer. Sie wurde in leicht modifizierter Form nachgebaut und eingesetzt. Die Abb. 5 zeigt das Bauprinzip und die Wirkungsweise. Durch ein Kapillarrohr wird das Eluens in die Mischkammer unmittelbar über einen Magnetrührstab geführt. Es durchspült die ganze Kammer und tritt an der Oberseite in einer Leitung aus, die direkt zum Injektor führt. Bei Gradienten-Betrieb wird das Lösungsmittel A, das zunächst die Kammer füllt, successive vom Lösungsmittel B verdrängt, welches über einen Dreiwege-Hahn vor der Pumpe einschleust werden kann. Der Gradientenmischer konnte wahlweise mit Kammern von 15 und 52 ml Inhalt betrieben werden. Bei guter Durchmischung resultierten reproduzierbar jeweils konvexe Gradienten-Profile, wobei aus der kleineren Kammer eher ein Stufengradient und aus der größeren eher ein linearer Gradient entstand. Der Verlauf des Gradienten ist später als gestrichelte Kurve in den Chromatogrammen der Carotinoid-

Analysen eingezeichnet; den Wechsel der Elutionsmittel vor der Pumpe markiert ein Pfeil.

4.2.3 Probenaufgabesysteme

Zur Probenaufgabe wurden drei verschiedene Systeme verwendet und auf ihre spezielle Eignung für die Carotinoid-Analyse überprüft.

Ein selbst hergestellter Septum-Injektor nach Vorlage eines von I. Halász beschriebenen Modells⁽⁵⁴⁾ zeigte einige nachteilige Eigenschaften. Das Septum-Material (Viton A - Gummi) wird durch Lösungsmittel wie z.B. Aceton und Acetonitril teilweise angegriffen und erschwert mit seinen Abbauprodukten erheblich die Detektion der eigentlichen Probe. Ferner werden bei den einzelnen Einspritzungen winzige Septum-Partikel ausgestanzt und auf den Säulenkopf gespült. Das hat zur Folge, daß die Gummis relativ schnell undicht werden und einer Erneuerung bedürfen. Daneben verstopfen die ausgestanzten Septum-Teilchen im Laufe der Zeit die Säule und machen die Erneuerung der Säulenkopf-Füllung in regelmäßigen Abständen erforderlich.

Ein von der Fa. Knauer vertriebenes pneumatisches Einspritz-System für Drucke bis 350 bar gewährleistete zwar eine einfache und bequeme Handhabung, doch für die Behandlung speziell der Carotinoid-Proben war es nicht geeignet. Es werden jeweils nur 10 µl injiziert, doch müssen zur Einspritzung ca. 5 ml Probenlösung in einem offenem Gefäß vorgelegt

werden, aus dem dann das Einspritzvolumen aufgezogen wird. Solche großen Lösungsvolumina sind keineswegs immer vorhanden. Außerdem sollten Carotinoid-Proben möglichst nur in dicht verschlossenen Gefäßen (Septum-Fläschchen) gehandhabt werden.

Für die vorliegenden Probleme erwies sich der Injektor der Fa. Waters vom Typ U6K als am besten geeignet. Er läßt neben analytischen Dosiervolumina auch die präparative Probenaufgabe zu. Sie erfolgt durch Verdrängen von Lösungsmittel aus einer Probenschleife bei Normaldruck mit einem frei wählbaren Spritzenvolumen von 1 μ l bis zu 2 ml. Durch Schalten eines Ventilsystems schleust man den Inhalt der Probenschleife vor den Säulenkopf in den Hochdruckteil ohne Unterbrechung des Pumpvorganges ein (s. Abb. 4). Dabei wird gleichzeitig der Beginn der Analyse auf dem Schreiber markiert. Auf die Dosiergenauigkeit, die man mit diesem Modell erreichen kann, wird in Kapitel 5.8.1.3 bei der Diskussion quantitativer Trennungen näher eingegangen.

4.2.4 Trennsäule

Als Trennsäulenmaterial wurden für die beschriebenen Versuche Edelstahlrohre der Firmen Schoeller-Werk KG, Hellenenthal, und Sandvik GmbH, Düsseldorf, eingesetzt. Vor der Packung erfolgte eine Vorbehandlung durch Spülen mit CH_2Cl_2 , $\text{H}_2\text{O}/\text{HCl}$ conc. 1:1, und Aceton. Die Rohre hatten Innendurchmesser von 2 - 3 mm und Längen von 30 cm - 1 m.

Sie wurden stets in gerader Form verwendet. Es zeigte sich, daß die Säulen mit nicht hochglanzpolierten Innenflächen gleich gute Ergebnisse in der Trennleistung brachten, wie speziell vorbehandelte. Besondere Aufmerksamkeit muß den Anschluß-Fittings an die Kapillar-Ein- und Ausgänge gezollt werden, um Totvolumina so weit als möglich zu vermeiden. Die kommerziell erhältlichen Reduzierstücke (Fa. Hoke, Frankfurt/Main) mußten aufgebohrt werden, damit die Kapillar-Zuleitungen direkt an die Säulenpackung geführt werden konnten.

Für die Trennleistung einer Säule ist die Packungsqualität von maßgeblicher Bedeutung. Um eine homogene und reproduzierbare Kolonnenpackung zu gewährleisten, sind geeignete, der Größe der Partikel angepasste Säulenfülltechniken zu verwenden. Im besonderen ist darauf zu achten, daß jede Produktionscharge des verwendeten Sorbens frei von Feinstanteilen ist.

Verfügt das Säulenfüllmaterial über Teilchendurchmesser von mehr als 20 μm , so lassen sich in der Regel gute und reproduzierbare Packungen erzielen, wenn man das Sorbens trocken in die Säule einfüllt. Nach der Methode der "Säulenfüllung durch Aufstoßen"⁽⁵⁵⁾⁽⁵⁶⁾ wurden jeweils kleine Portionen (ca. 200 mg) eingefüllt und nach jeder Zugabe die Säule in senkrechter Stellung bis zu zehnmal leicht auf eine harte Unterlage gestoßen.

Bei Teilchen, die im Durchschnitt einen Durchmesser von weniger als 20 μm besitzen, wurde das "balanced-slurry"-

Verfahren von J.J. Kirkland⁽⁵⁷⁾ angewendet. Dazu bereitet man sich eine Teilchensuspension mit einem an die Dichte des jeweiligen Sorbens angepassten Lösungsmittelgemisch und preßt diese sich im Schwebezustand befindliche Suspension in einer Art Druckfiltration in die Kolonne. Für Kieselgel (Dichte ca. $1,9 \text{ g/cm}^3$) empfiehlt sich ein Gemisch aus 1,1,2,2-Tetrabromäthan (Dichte $2,96 \text{ g/cm}^3$) und Dioxan/Tetrachlorkohlenstoff (1:1). Speziell für diese Fülltechnik wurde eine von W. Strubert beschriebene Säulenfüllapparatur⁽⁵⁸⁾ nachgebaut und eingesetzt. Sie besteht aus einem druckfesten Edelstahlzylinder, der am unteren Ende konisch zuläuft und dort mit der zu füllenden Säule verschraubt wird. Auch eine Variation der beschriebenen Methode, die Verwendung von Suspensionen in Flüssigkeiten mit hoher Viskosität (Cyclohexanol/Isopropanol = 2/1), zeigte gute Packungs-Ergebnisse. Bei beiden Verfahren wurde die zu füllende Säule unter schwacher Vibration gehalten. Nach Beendigung des Füllvorganges (Dauer ca. 1 Stunde bei Maximal-Druck der Pumpe) müssen die Komponenten der Schwebeflüssigkeit durch Spülen der Kolonne mit einem geeigneten Lösungsmittel entfernt werden. Die endgültige Konditionierung erfolgt dann mit der für die Trennung benötigten mobilen Phase.

4.2.5 Detektoren

Zur Proben-Detektion diente ein speziell für die HPLC kon-

zipiertes Zweistrahl-Spektralphotometer der Fa. Schoeffel Instrument GmbH, Trappenkamp, Typ SF 770, mit einem Arbeitsbereich von 200 - 630 nm. Das typische Rauschen des Gerätes beträgt 5×10^{-4} Extinktions-Einheiten (EE) bei einem Küvettenvolumen von ca. 8 μ l. Die Lichtquellen für die Bereiche 200 - 400 nm (Deuterium-Lampe) und 350 - 630 nm (Wolfram-Lampe) können nach Wahl auf einer optischen Bank wechselseitig ausgetauscht werden.

Unmittelbar nach Verlassen des Photometers wurde das Eluens durch ein Differential-Refraktometer (Fa. Waters, Typ R 401) geleitet. Es hatte die Aufgabe, den Verlauf des Gradienten zu vermessen und wurde deshalb mit sehr geringer Empfindlichkeit betrieben. Außerdem gab es mit dem Signal für das Probenlösungsmittel, das beim Spektralphotometer im sichtbaren Bereich meist ausblieb, Möglichkeiten, die Totzeit t_0 einer Analyse zu ermitteln.

Beide Detektoren waren mit einem Zweikanal-Schreiber der Fa. Leeds & Northrup GmbH, Düsseldorf, Typ Speedomax XL 682, gekoppelt. Man hat damit die Möglichkeit, gleichzeitig die Detektion der Proben mit dem Spektralphotometer und die Beschreibung des Gradienten mit dem Differential-Refraktometer nebeneinander zu registrieren.

5 HPLC-Trennung von pflanzlichen, tierischen und
 synthetischen Carotinoiden

5.1 Isolierung aus biologischem Material

Bei der Gewinnung von Carotinoiden aus biologischem Material muß berücksichtigt werden, daß bei dessen Lagerung successive beträchtliche Anteile der Pigmente zerstört werden. Für pflanzliches Material kommen dabei zwei Mechanismen zum Tragen: enzymatische Oxidation mit molekularem Sauerstoff und photochemische Zerstörung, die durch die Anwesenheit von Sauerstoff noch begünstigt wird. Es wurde deshalb darauf geachtet, daß stets frisches Material eingesetzt werden konnte.

Die Extraktion erfolgte durch Zerreiben des pigmenthaltigen Materials (ca. 100 g) im Mörser unter Zugabe von Seesand und etwas CaCO_3 zur Neutralisation des Zellsaftes. Nach der vollständigen Zerschlagung des Gewebes wäscht man mit 80%-igem Aceton durch eine Glasfilternutsche bis zur Farblosigkeit⁽⁶⁰⁾ des Filtrats. Die Pigmente werden dann nach Boardman und Anderson⁽⁶¹⁾ in Äther überführt und die Ätherphase mit 1%-iger wäßriger NaCl-Lösung gewaschen. Um veresterte Xanthophylle zu verseifen, behandelt man den Ätherextrakt mit im Endvolumen ca. 6%-iger methanolischer KOH und rührt die Lösung ca. zwei Stunden lang. Das hat gleichzeitig zur Folge, daß unerwünschte pflanzliche oder tierische Fette und auch Chlorophylle hydrolysiert und danach abgetrennt werden können. Mit 4%-iger wäßriger NaCl-Lösung wird die Ätherphase

frei von wasserlöslichen Verseifungsprodukten und von KOH gewaschen. Nach Trocknung mit Na_2SO_4 erhält man einen nur noch Carotinoide enthaltenden Ätherextrakt.

Es ist selbstverständlich, daß alle Operationen nach Möglichkeit im Dunkeln oder zumindest in diffusem Licht durchgeführt wurden und daß mit Schutzgas (N_2) der Zutritt von Luft weitestgehend vermieden wurde.

5.2 Behandlung der Proben

Um Carotinoid-Extrakte über längere Zeit hinweg aufzubewahren ist es ungünstig, sie in ätherischer Lösung zu belassen, da nach Bildung von Peroxiden Oxidationen zu erwarten sind. Sie wurden deshalb stets in für die Analyse geeigneter Konzentration in n-Hexan oder Aceton gelöst und unter Schutzgas in braune Septum-Fläschchen gefüllt. Unter diesen Bedingungen konnten sie einige Monate lang bei $< 0^\circ\text{C}$ unzersetzt aufbewahrt werden. Lediglich die Bildung von cis-trans Isomeren ist auch bei dieser schonenden Form der Behandlung auf Dauer nicht zu verhindern. Sie hat jedoch den großen Vorteil, daß man beliebige Mengen aus einer Lösung mit stets konstanter Konzentration mit Spritzen entnehmen kann, ohne sie dabei mit Luft in Berührung zu bringen.

5.3 Identifizierungsmöglichkeiten für Carotinoide nach der Trennung mit HPLC

Prinzipiell stehen der Identifizierung von Pigmenten, die mit Hilfe der HPLC aus einem Gemisch rein dargestellt worden sind, alle der bislang geübten Verfahren offen.

Es hat sich hier jedoch wie auch bei allen anderen Methoden erwiesen, daß es selbst nach einer einwandfreien chromatographischen Trennung nicht einfach ist, die Pigmente exakt zuzuordnen, weil in der Regel authentische Vergleichssubstanzen fehlen. Außerdem ist der Bezug auf in der Literatur dokumentierte Daten manchmal irreführend, wenn diese auf mangelhaften Trennungen oder teilweise oxidierten Proben beruhen.

Den ersten Hinweis auf die Natur eines unbekannten Pigmentes erhält man bei der HPLC-Analyse mit "reversed phase"-Trennsystemen analog zu den klassischen Verfahren aus dem Retentionsverhalten der Substanzen. Der Vergleich mit Werten aus Tabellen, in denen eine Reihe von Carotinoiden nach ihrer unterschiedlicher Adsorptionskraft geordnet sind⁽⁶²⁾⁽⁶³⁾, erlaubt zunächst eine weit gefaßte Zuordnung. Die Eigenschaften von "reversed phase"-Sorbenzien, die Elutionsreihenfolgen, welche von polarem Trennmateriel her bekannt sind, nicht exakt umzukehren, läßt die Charakterisierung aufgrund bekannter Sorptionseigenschaften nur in einem weiteren Rahmen zu.

Von größerer, bei den hier durchgeführten Versuchen von entscheidender Bedeutung ist die Charakterisierung der Pigmente

nach ihren Absorptionsspektren im sichtbaren Spektralbereich. Für diesen Zweck war es bei der verwendeten Apparatur notwendig, die auf mikro-präparativen Säulen getrennten Substanzen zu isolieren und in einem geeigneten Lösungsmittel die Absorption zu vermessen.

Mit einigen modernen Spektralphotometern, die direkt als Detektor an die Trennsäule angeschlossen werden, ist es inzwischen möglich, bei kurzzeitig gestoppter Elution das Absorptionsspektrum der Proben im Peak-Maximum sofort in der Durchflußzelle des Detektors zu vermessen. Allerdings ist man dann auf das jeweilige Elutionsmittel als Lösungsmittel angewiesen; Rückschlüsse auf tabellierte Absorptionsmaxima⁽⁶⁴⁾⁽⁶⁵⁾⁽⁶⁶⁾ in ausgewählten Solvenzien werden erschwert.

Die Absorptionskurven der isolierten Pigmente wurden in einem selbstregistrierenden Spektralphotometer (Unicam, Modell SP 700) gemessen. Für die Zuordnung wurden neben der Lage der Maxima die % III/II -Werte, die von Liaaen-Jensen eingeführt worden sind⁽⁶⁷⁾, nur in seltenen Fällen herangezogen, da ihre Aussagekraft sehr beschränkt ist. Dabei stellt III die Höhe des langwelligen Absorptionsgipfels und II die Höhe des mittleren Absorptionsgipfels (λ_{max}) dar; das Minimum zwischen diesen beiden Maxima wird als Basislinie angenommen.

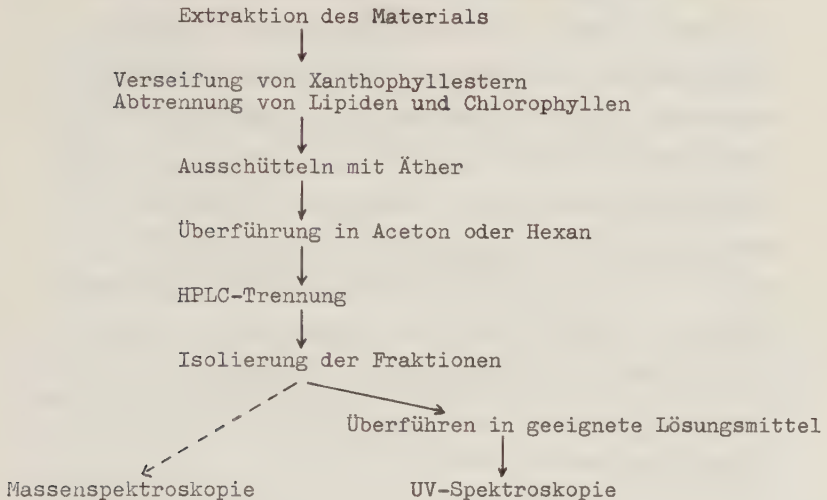
In Fällen, bei denen einzelne Carotinoid-Konzentrationen überdurchschnittlich groß waren, bestand auch die Möglichkeit, Massenspektren aufzunehmen.

Auf die Durchführung von Farbreaktionen wurde generell verzichtet, weil sie im allgemeinen wenig spezifisch und damit kaum aussagekräftig sind.

Zur Behandlung von Epoxiden mit Salzsäure in Chloroform, wobei nach P. Karrer⁽⁶⁸⁾ Carotinoide mit furanoiden Gruppen entstehen, die dann bei kürzeren Wellenlängen absorbieren, standen kaum ausreichende Substanzmengen zur Verfügung. Da bei diesem Nachweis auch nichtepoxidische Carotinoide verändert werden können⁽⁶⁹⁾, ist er für Identifizierungen nur mit Vorsicht anzuwenden.

Dadurch, daß bei HPLC-Analysen von Carotinoiden selbst kleinste Pigment-Spuren erfaßt werden, entstehen im Vergleich zu den klassischen Trennmethode neue Anforderungen an Identifizierungsmöglichkeiten. Allein die Tatsache, daß bei der HPLC-Trennung der Pigmente eines Paprikaschoten-Extraktes ca. 30 Carotinoide mit unterschiedlichsten Konzentrationen innerhalb eines Analysenganges zu detektieren sind (s. Seite 102), weist auf die immensen Schwierigkeiten hin, die sich durch diese neue Trenntechnik für umfassende Identifizierungen ergeben.

5.4 Schematische Darstellung des Analysenganges



5.5 "HPLC-Trennungen" von Carotinoiden an polaren Sorbenzien

Begreift man den Ausdruck "HPLC" als "High Pressure Liquid Chromatography" und gleichzeitig als "High Performance Liquid Chromatography" im Sinne hochauflösender schneller Flüssigkeits-Chromatographie, so muß man feststellen, daß gemessen an diesen Kriterien echte HPLC-Trennungen von Carotinoiden bisher noch nicht bekannt waren. Arbeiten, die trotzdem mit diesem Attribut bedacht werden, sollen kurz einer näheren Betrachtung unterzogen werden.

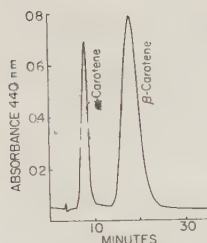
J.P. Sweeney und A.C. Marsh⁽⁷⁰⁾ beschrieben Trennungen von Stereoisomeren des α - und β -Carotins aus pflanzlichem Ma-

terial. Sie verwendeten mit MgO und Hyflo Super Cel (1:2) bzw. mit MgO und Ca(OH)_2 (1:6) gefüllte Glassäulen und eluierten mit Petroläther/Aceton-Gemischen. Mit einem Stickstoff-Vordruck von 20 psi = 1,36 bar erzeugten sie die nötige Fließmittelgeschwindigkeit; Aussagen über Analysenzeiten und Trennschärfen liegen nicht vor. Berücksichtigt man noch, daß die verwendeten Sorbenzien in Bezug auf Siebfraktionen und Teilchenformen ("fein gepulvert") in keiner Weise charakterisiert worden sind, so kann man feststellen, daß die dargestellten Trennungen, die ohne Zweifel für die spezielle Anwendung auf Carotin-Isomere gute Ergebnisse gezeigt haben, mit der HPLC in keinem Zusammenhang stehen.

Weiter entwickelt im Sinne der HPLC sind Untersuchungen von I. Stewart und T.A. Wheaton⁽⁷¹⁾. Sie setzten ebenfalls polare Phasen als Sorbenzien ein und fanden heraus, daß sich für die Trennung von Carotinene MgO und für Xanthophylle ZnCO_3 unter Verwendung von Hexan mit wechselnden Anteilen an höheren Alkoholen als mobile Phase am besten eignet. Aussagen über Teilchengrößen und Siebfraktionen wurden auch hier nicht gemacht. Aus dem Chromatogramm für einen Karotten-Extrakt (Abb. 6) ist ersichtlich, daß die Effektivität dieser Säulen sehr beschränkt ist.

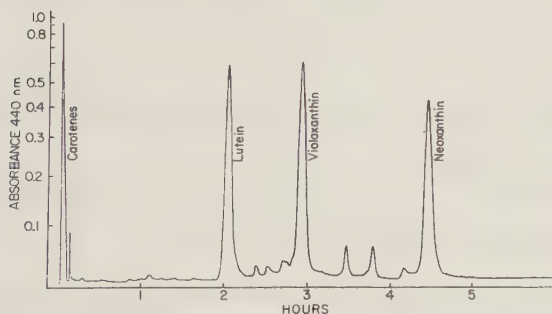
Innerhalb von 25 Minuten ist die Peak-Kapazität, d.h. die maximale Anzahl vollständig aufgelöster Banden pro Zeiteinheit, mit den beiden Signalen für α - und β -Carotin be-

Abb. 6:



Chromatogram from a carrot extract; Column: Sea Sorb 43, 4 mm I.D. $\times$ 280 mm long, glass; solvent: hexane containing 5% TPA; flow rate: 1.0 ml/min; temperature: room temperature.

reits voll erschöpft. Für den β -Carotin-Peak errechnet sich eine Zahl an theoretischen Böden von weniger als 100 (Def. s. Seite 52). Um eine größere Zahl von Substanzen in einem Analysengang zu erfassen, war es notwendig, die Analysenzeiten deutlich auszudehnen. Damit dauert die Trennung der Carotinoide eines Spinat-Extraktes selbst bei Anwendung eines Elutionsgradienten noch nahezu fünf Stunden (Abb. 7):



Chromatogram of a spinach extract. Zinc carbonate column using a hexane TPA gradient. Column: ZnCO_3 , $\frac{1}{4}$ in. O.D. $\times$ 13.5 cm stainless steel. Solvent: chamber 1, 90 ml hexane, 1 g BHT; chamber 2, 89 ml hexane, 1 ml TPA; chamber 3, 65 ml hexane, 20 ml TPA. Flow rate: $\frac{1}{2}$ ml/min; temperature: 15°.

Obwohl zur Förderung des Eluensstromes für diese Analysen eine Hochdruck-Pumpe eingesetzt worden ist, kann man auch in diesem Fall bestimmt noch nicht von echter, moderner Flüssigkeits-Chromatographie sprechen. Die erreichte Trennleistung und Analysendauer lassen sich nicht mit den gestellten Anforderungen an die HPLC vereinigen.

Moderne Flüssigkeits-Chromatographie wurde von M. Vecchi et al.⁽⁷²⁾ zur Trennung von Carotin-Vorstufen, speziell von Vitamin A- Derivaten, angewendet. Sie setzten Kieselgel und Aluminiumoxid einer Partikelgröße von 5 - 10 μm ein und eluierten mit Hexan, das mit kleinen Anteilen von Dioxan oder Diäthyläther modifiziert wurde. So konnten sie innerhalb von ca. 50 Minuten neun Isomere des Vitamin A - Acetats trennen. Die Tatsache, daß die zu trennenden Substanzen als Reinsubstanzen vorlagen und in dem jeweils erwünschtem Anteil dem Trenngemisch zugesetzt werden konnten, erleichterte diese Analyse beträchtlich.

Generell kann man sagen, daß die Reproduzierbarkeit von Trennungen an Säulen mit polaren Sorbenzien unter der notwendigen Verwendung hochgereinigter absoluter Lösungsmittel große Probleme in sich birgt. Schon Wassergehalte im Eluens von ca. 100 ppm verändern die Retentions-Daten von Substanzen beträchtlich⁽⁷³⁾; sie können auch mit größter Sorgfalt auf Dauer nicht ausgeschlossen werden.

Gegenüber diesen "nackten" Adsorbenzien besitzen chemisch modifizierte stationäre Phasen vom Bürstentyp⁽⁷⁴⁾ entscheidende Vorteile in der Handhabung. Sie erfüllen in nahezu

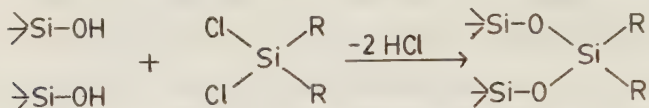
jeder Beziehung die von J.B. Wilkes⁽⁷⁵⁾ schon 1946 aufgestellten Forderungen an ein "ideales" Sorbens: Es soll billig und leicht kommerziell erhältlich sein; es sollte leicht zu packen sein und auch bei Austrocknen der Säule sich nicht verändern; es sollte keiner speziellen Aktivierungs- oder Lagerungsbehandlung bedürfen; und schließlich sollte es große Flußgeschwindigkeiten des Eluenten und eine schnelle Entwicklung des Chromatogramms ermöglichen. Moderne Sorbenzien mit chemisch gebundenen Phasen, die sog. "reversed phase"-Materialien, erfüllen diese Kriterien und zeigen überdies bei richtiger Verwendung noch hervorragende Trenneigenschaften. Aus diesen Gründen boten sie sich für Carotinoid-Analysen an, die auf die Übernahme zum späteren Routine-Einsatz hin konzipiert werden sollten, und sie erwiesen sich als geradezu prädestiniert für diese Zwecke.

5.6 Charakterisierung der "reversed-phase"-Technik

Seit einiger Zeit finden in der Gas- und in der Hochdruck-Flüssigkeits-Chromatographie stationäre Phasen Verwendung, bei denen die Oberfläche eines anorganischen Festkörpers (Kieselgel) durch chemisch gebundene organische Moleküle modifiziert wird. Je nach den eingeführten funktionellen Gruppen weisen diese Materialien eine mehr oder weniger starke Oberflächenpolarität auf. Hydrophobiert man die oberflächenständigen Hydroxylgruppen von Silicagelen mit aliphatischen Ketten, so erreicht man ein Minimum an wirk-

samer Polarität.

Diese Umsetzung kann z.B. mit der folgenden heterogenen Reaktion durchgeführt werden:



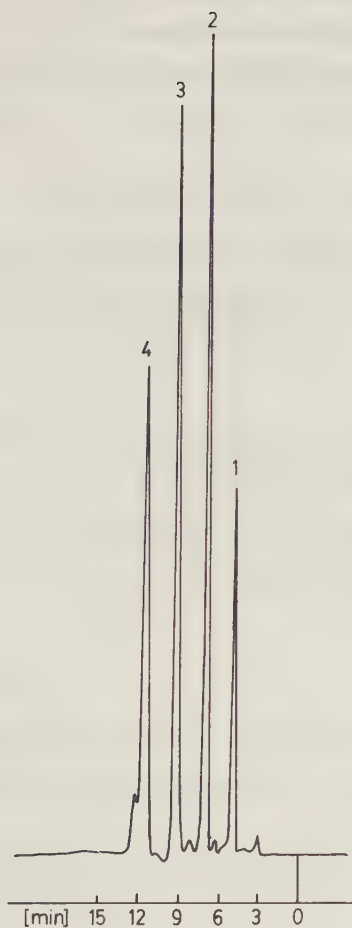
Für die vorliegende Arbeit wurden im Handel erhältliche Gele mit $\text{R} = \text{C}_8\text{H}_{17}$ und $\text{C}_{18}\text{H}_{37}$ verwendet. Nicht umgesetzte "freie" Silanolgruppen wurden durch die Methylrot-Probe⁽⁷⁶⁾ nachgewiesen und mit Hexamethyldisilazan (HMDS) und katalytischen Mengen $(\text{CH}_3)_3\text{SiCl}$ nach der Vorschrift von J. Bohemen et al.⁽⁷⁷⁾ nachsilanisiert.

Aus einer reinen Adsorptionsphase ist nun eine Art Verteilungsphase geworden, auf der eine umgekehrte Elutionsreihenfolge gefunden wird; der Name "reversed phase" kennzeichnet diesen Effekt.

Die Si-C -Bindungen sind temperaturstabil bis ca. 200 °C und hydrolysestabil in einem pH-Bereich von 2 - 9⁽⁷⁸⁾. Dadurch ist der Rauschpegel der Basislinie, bedingt durch "Säulenbluten", zu vernachlässigen und man erhält bei präparativen Arbeiten "saubere Fraktionen".

"Reversed-phase"-Materialien erlauben einen schnellen Massentransport in der stationären Phase und sind damit auf kurze Analysenzeiten hin ausgelegt. Die Abb. 8 zeigt dies am Beispiel der kompletten Trennung eines Aromaten-Testgemisches mit vier Komponenten innerhalb von lediglich zwölf Minuten.

Abbildung 8:



Trennung von 4 aromatischen Kohlenwasserstoffen.
Säule: L = 30 cm, I.D. = 4 mm; Sorbens: NUCLEOSIL 10 C₈,
10 µm; mobile Phase: Methanol/Wasser = 100/40 v/v; Druck:
160 bar; Durchfluß: 1,2 ml/min; Detektor: UV 254 nm.

(1) Benzol, (2) Naphthalin, (3) Biphenyl, (4) Phenanthren.

Die Trennmechanismen, die sich an Sorbenzien mit chemisch gebundener Phase abspielen, sind bis heute noch nicht völlig aufgeklärt. Es gilt aber als sicher, daß sowohl Adsorptions- als auch Verteilungsgleichgewichte an den Phasengrenzen nebeneinander vorliegen und zusammen auf das Trennergebnis Einfluß nehmen.

In der Regel werden unpolare Stoffe stärker retardiert als polare, doch nicht selten wird diese Ordnung von Stoffen sehr ähnlicher Polarität durchbrochen. Das weist wieder auf das komplizierte Zusammenwirken von Adsorption und Verteilung hin.

5.7. Diskussion der Parameter

Die zur Charakterisierung einer Trennung notwendigen Parameter werden im folgenden mit Symbolen nach J.J. Kirkland⁽⁷⁹⁾ beschrieben.

Retention

Die Retentionszeit t_R einer zu chromatographierenden Komponente setzt sich aus der Totzeit t_0 der Säule und der Nettoretentionszeit t'_R zusammen, wobei die Totzeit die Aufenthaltsdauer eines nicht retardierten Peaks in der Säule angibt.

$$t_R = t_0 + t'_R$$

Alle Aussagen über Retentionsdaten sind abhängig von der Strömungsgeschwindigkeit (u) der mobilen Phase und anderen

äußeren Parametern (Temperatur, Druck, usw.).

Das Verhältnis der Aufenthaltszeiten einer Komponente in der stationären und in der mobilen Phase (t'_R und t_o) bezeichnet man als Kapazitäts- oder Massenverteilungsverhältnis k' :

$$k' = \frac{t'_R}{t_o} = \frac{t_R - t_o}{t_o}$$

Die relative Retention beschreibt das Verhältnis der Kapazitätsverhältnisse zweier Substanzen:

$$\alpha = \frac{k'_2}{k'_1}$$

Sie stellt ein Maß für die Selektivität des jeweiligen benutzten Trennsystems dar. Die relative Retention ist umso größer, je selektiver die stationäre Phase eine der beiden Komponenten festhält. Bei $\alpha = 1$ liegt keine Trennung mehr vor.

Bandenverbreiterung

Der quantitative Ausdruck für die Bandenverbreiterung ist durch die Bodenhöhe h gegeben, die bei konstanten Analysenbedingungen jeweils für eine Komponente definiert ist. Sie kann über folgende Meßwerte aus dem Schreiberdiagramm bestimmt werden:

$$h = \frac{L}{16} \left(\frac{t_R}{w} \right)^2$$

Die Basisbreite w erhält man als Abschnitt der Grundlinie zwischen den beiden Wendetangenten des Peaks. L steht für die Säulenlänge.

Die theoretische Bodenzahl N wird durch folgende Gleichung charakterisiert:

$$N = \frac{L}{h} = 16 \cdot \left(\frac{t_R}{w} \right)^2 = 5,54 \cdot \left(\frac{t_R}{w_{0,5}} \right)^2$$

wobei $w_{0,5}$ die Peakbreite in halber Höhe darstellt.

Eine weitere Beschreibung des Leistungsvermögens einer Trennsäule bietet die effektive Bodenzahl N_{eff} :

$$N_{\text{eff}} = 16 \cdot \left(\frac{t'_R}{w} \right)^2 = 5,54 \cdot \left(\frac{t'_R}{w_{0,5}} \right)^2$$

Bodenhöhe und Bodenzahlen beziehen sich lediglich auf die Qualität einer Säule, nicht jedoch auf die einer Trennung.

Auflösung

Die direkte Aussage über die Vollständigkeit einer Trennung zweier Komponenten A und B macht die Auflösung R_{AB} :

$$R_{AB} = 2 \cdot \frac{t'_{R2} - t'_{R1}}{w_2 + w_1}$$

Mit dem Anwachsen von R_{AB} verbessert sich die Auftrennung der beiden Peaks. Vollkommene Grundlinientrennung erhält man bei $R = 1,5$. Wird der R_{AB} -Wert von 0,8 unterschritten,

so ist die Auflösung ungenügend.

In der Praxis ist man bemüht, in Bezug auf kurze Analysenzeiten und hohe Auflösungen hin die Trennbedingungen "optimal" zu gestalten. Oft läßt sich das eine nur auf Kosten des andern verbessern, so daß man in der Regel zu Kompromissen gezwungen ist.

5.8 Trennungen an "reversed-phase"-Systemen

5.8.1 Carotinoide von Solanum lycopersicum

Von der Frucht der Tomate (*Solanum lycopersicum*) sind eine Reihe von Carotinoiden bekannt. Das dominierende Pigment stellt Lycopin dar. Es kann in Anteilen bis zu 95% des Gesamt-Carotinoid-Gehaltes auftreten⁽⁸⁰⁾. Die Restpigmente setzen sich aus Carotin-Kohlenwasserstoffen mit β -Carotin an der Spitze und einigen Xanthophyllen zusammen. Der Reifegrad der Frucht bestimmt maßgeblich Art und Anteile der auftretenden Pigmente.

Der Absolut-Gehalt an Carotinoiden beträgt ca. 400 μg pro Gramm Trockengewicht der Tomaten. Er kann bei verschiedenen Spezies stark variieren.

Neben der HPLC-Trennung und Zuordnung der Pigmente sollten am Beispiel der Carotinoide der Tomaten-Frucht Untersuchungen gemacht werden über Optimierbarkeiten von Isomeren-Trennungen mit Ag^+ -haltigen Lösungsmitteln, über die Wiederholbarkeit von isokratischen Analysen am "reversed-phase"-System und

schließlich über die Möglichkeiten quantitativer Aussagen.

5.3.1.1 Trennung und Identifizierung der Carotinoide

Da die Hauptbestandteile der Gesamtcarotinoide von *Solanum lycopersicum* aus Lycopin und β -Carotin bestehen und nur in sehr geringem Maße andere Carotine und Xanthophylle daneben vorliegen, richtet sich das Interesse vornehmlich auf die Trennung dieser beiden Komponenten. Sie sind sich als reine Kohlenwasserstoffe ($C_{40}H_{56}$) in der Polarität sehr ähnlich, unterscheiden sich aber deutlich in der Struktur (s. Seite 5 und 8).

Die Trennung von β -Carotin und Lycopin als Reinsubstanzen zeigen die Abbildungen 9 und 10 an zwei verschiedenen Säulen.

Die Auflösung der Trennung von Abb. 9 ist mit einem Wert von $R_{2-1} = 0,74$ unbefriedigend, während Abb. 10 eine Grundlinientrennung zeigt ($R_{2-1} > 1,5$). Das ist in erster Linie auf die unterschiedlichen Teilchengrößen der verwendeten Sorbenzien zurückzuführen. Während NUCLEOSIL 10 C_{18} (Macherey-Nagel & Co) in Korngrößen von $10 \pm 1,5 \mu m$ (nach Angaben des Herstellers) vorliegt, bewegen sich die Partikelgrößen von CORASIL C_{18} (Waters) in einem Bereich von $37 - 50 \mu m$.

Noch deutlicher zeigen sich die Vorteile der mit kleinen Teilchen gepackten Säule bei der Trennung eines Tomaten-Extraktes in den Abbildungen 11 und 12. Während die CORASIL C_{18} -Säule selbst bei Erhöhen der Polarität des Lösungsmittels (=Erhöhung der k' -Werte) nur eine

Abbildung 9:

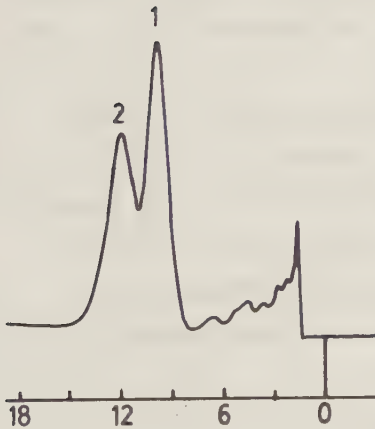
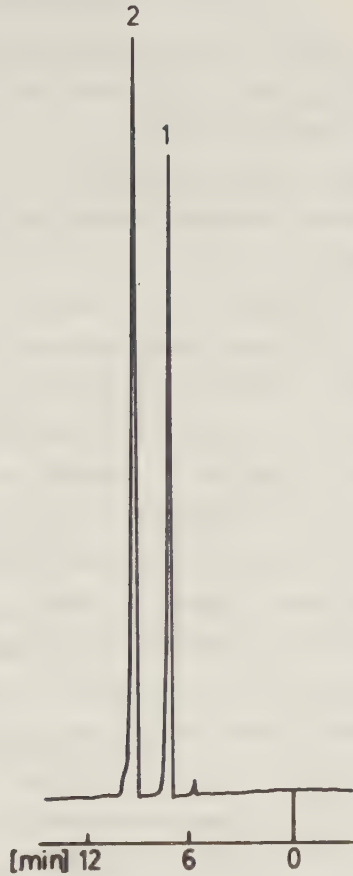


Abbildung 10:



Trennung von Lycopin(1) und β -Carotin(2).

Abb. 9: Säule: L = 50 cm, I.D. = 6 mm; Sorbens: CORASIL C₁₈, 37-50 μ m; mobile Phase: Aceton/Wasser = 100/20 v/v; Druck: 30 bar; Durchfluß: 1,1 ml/min; Detektor: UV 450 nm.

Abb. 10: Säule: L = 50 cm, I.D. = 6 mm; Sorbens: NUCLEOSIL 10 C₁₈, 10 μ m; mobile Phase: Aceton/Wasser = 100/5 v/v; Druck: 53 bar; Durchfluß: 2,5 ml/min; Detektor: UV 450 nm.

sehr unvollkommene Auflösung der beiden Hauptkomponenten zeigt, ist aus der Trennung mit der NUCLEOSIL 10 C₁₈-Säule zu ersehen, daß selbst zwischen den beiden Haupt-Peaks eine weitere kleine Bande noch sehr gut aufgelöst ($R_{3-2} = 1,3$) registriert wird.

Die nadelförmigen Peaks in Abb. 11 deuten auf die hervorragende Leistungsfähigkeit der verwendeten Säule hin. Für Peak 4 errechnet sich eine theoretische Bodenzahl von $N = 7670$ ($h = 65 \mu m$); das entspricht bei der 50 cm-Säule 15.340 theoretischen Böden pro Meter Trennsäule! Diese Daten ermöglichen im Gegensatz zu der Trennung in Abb. 6 auf Seite 45 eine enorme Peak-Kapazität bei kurzen Analysenzeiten. Nach ca. 10 Minuten ist die komplette Trennung der Extrakt-Pigmente abgeschlossen.

Ein weiterer großer Vorteil ergibt sich durch die hochauflösende Analyse der Abb. 11 gegenüber Abb. 12 damit, daß bei gleicher Empfindlichkeit des Detektors nur Bruchteile an Substanzmengen für gleichhohe Signale benötigt werden. Dieser Aspekt ist gerade für die Carotinoid-Analytik, die sich oft an den untersten Erfassungsgrenzen bewegt, von besonderer Bedeutung.

Die Identifizierung der getrennten Substanzen macht beim Tomaten-Extrakt kaum Schwierigkeiten, wenn man sich auf die Hauptkomponenten des Chromatogramms in Abb. 11 beschränkt. Lycopin und β -Carotin sind, wie schon erwähnt, als dominierende Pigmente aus der Literatur bekannt⁽⁸²⁾ und lagen außerdem als Reinsubstanzen zum Vergleich vor. Durch wechsel-

Abbildung 11:

Trennung der Carotinoide von
"Solanum lycopersicum".

Abb. 11: Säule: L = 50 cm, I.D. =
6 mm; Sorbens: NUCLEOSIL 10 C₁₈,
10 µm; mobile Phase: Aceton/Wasser =
100/5 v/v; Druck: 53 bar; Durchfluß:
2,5 ml/min; Detektor: UV 450 nm.

Abb. 12: Säule: L = 50 cm, I.D. =
6 mm; Sorbens: CORASIL C₁₈, 37-50 µm;
mobile Phase: Aceton/Wasser = 100/25
v/v; Durchfluß: 1,3 ml/min; Detektor:
UV 450 nm.

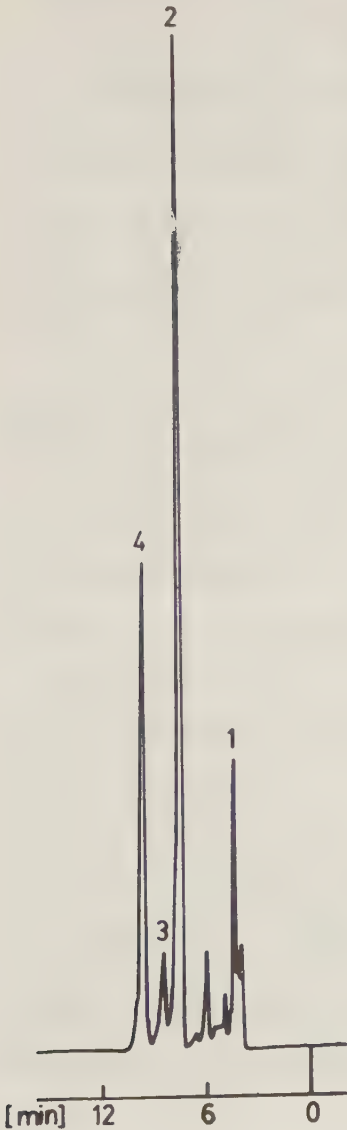
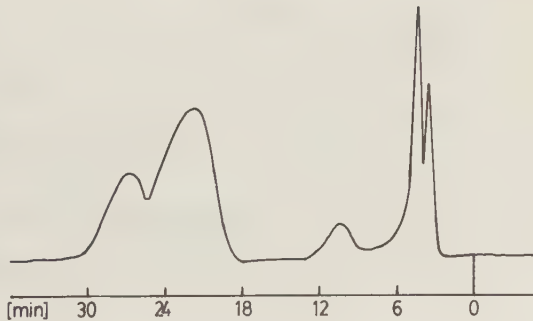


Abbildung 12:



seitiges Zumischen konnte Peak 2 Lycopin und Peak 4 β -Carotin zugeschrieben werden, was auch aus dem Vergleich mit der Abb. 10 hervorgeht.

Zusätzlich zu diesem Nachweis wurden mit der NUCLEOSIL 10 C_{18} -Säule mikropräparative Trennungen durchgeführt, die für die Peaks 2 und 4 die Isolierung von genügend Substanz (ca. 10 μ g je Durchlauf) zur Aufnahme von UV-Spektren zuließen. Die Absorptions-Maxima wurden ermittelt und in Tab. 1 aus der Literatur bekannten Daten gegenübergestellt.

Tabelle 1:

	$\lambda_{\max}$ (in Hexan) [nm]			Autor
<u>Lycopin</u>	444	471	500	A.Hager et al. ⁽⁸³⁾
	446	472	505	O.Isler et al. ⁽⁸⁴⁾
	447	471	501	F.H.Foppen ⁽⁶⁴⁾
<u>Peak 2</u> in Abb.11	444	469	500	eigene Messung
<u>β-Carotin</u>	425	450	477	A.Hager et al. ⁽⁸³⁾
		451	482	P.Karrer et al. ⁽⁸⁵⁾
	425	450	476	F.H.Foppen ⁽⁶⁴⁾
<u>Peak 4</u> in Abb.11	425	449	475	eigene Messung

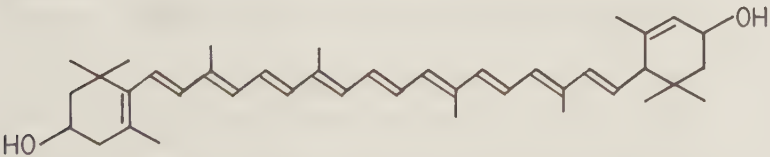
In Anbetracht der manchmal beträchtlichen Unstimmigkeiten, die publizierte UV-Daten aufweisen, ist in diesem Fall die Zuordnung von Lycopin und β -Carotin eindeutig. Das für diese Arbeit benützte UV-Gerät ist in Bezug auf die $\lambda_{\max}$ -Werte von

Holmium innerhalb eines Bereiches von ± 1 nm geeicht worden.

Die Identifizierung von Peak 1 in Abb. 11 ist aus dem isokratischen Chromatogramm nicht möglich. Es ist aus der kurzen Retentionszeit allein die Zugehörigkeit zu der Gruppe der Xanthophylle zu ersehen. Den direkten Vergleich mit Retentionsdaten bekannter Xanthophylle gestattet die Gradient-Elutions-Analyse, die in der Abb. 13 gezeigt ist. Der Pfeil kennzeichnet den Beginn der Zumischung des zweiten Elutionsmittels im Niederdruckteil der Apparatur.

Die Gegenüberstellung mit Analysen von Spinacia oleracea unter gleichen Bedingungen gestattet die Zuordnung des Peak 1 als Lutein aufgrund gleicher Retention. Zeaxanthin wird zwar auch gleich stark retardiert, ist in der Literatur aber, soweit bekannt, nicht als Pigment der Tomate beschrieben und scheidet damit aus.

Lutein:



Durch die Gradient-Analyse können neben Lycopin und β -Carotin noch vier weitere Carotine im Chromatogramm in Form von Schultern bzw. unvollständig getrennten Banden detektiert werden. Ihre Identifizierung war mit den vorhandenen Mitteln (Vergleichssubstanzen!) nicht möglich.

Es wurden Versuche unternommen, die Spuren von Carotin-

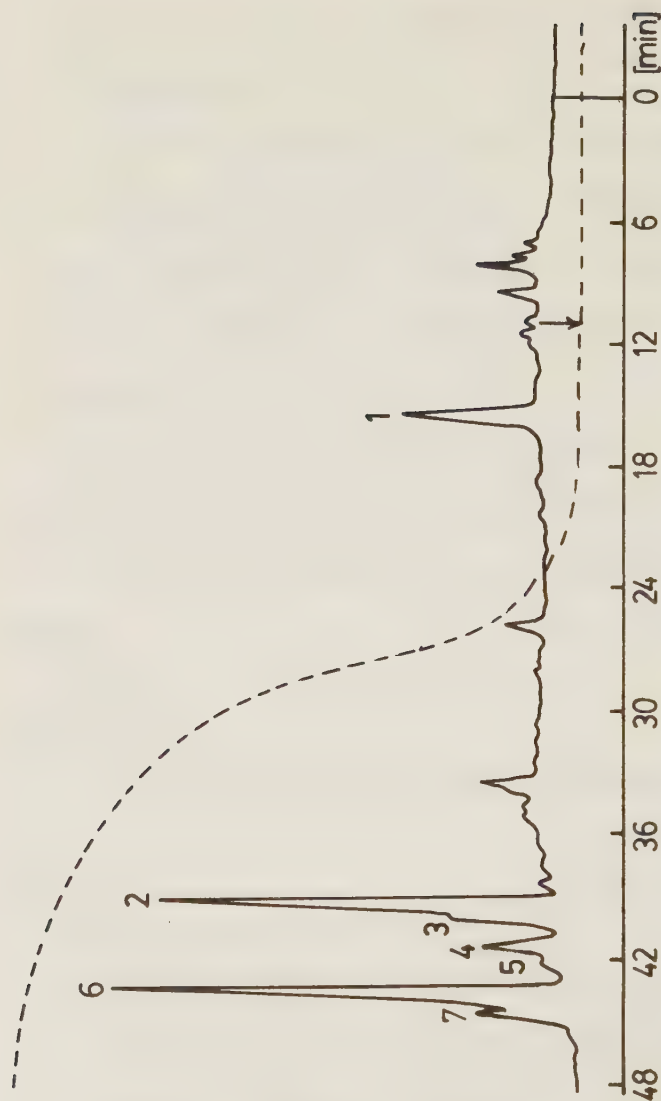


Abbildung 13: Gradient-Analyse der Carotinoide von "Solana lycopersicum"

Säule: L = 50 cm, I.D. = 6 mm; Sensor: NUCLEOSIL 10 C₁₈; 10 µm;
mobile Phase: Gradient von Acetonitril/Wasser = 100/25 nach 100/70;
Druck: 60 bar; Durchfluß: 1,0 l/min; Detektor: UV 470 nm.

Isomeren des isokratischen Analysenlaufes noch besser aufzutrennen. Als Grundlage dienten Arbeiten von G. Schomburg et al.⁽⁸⁶⁾, denen es gelungen ist, mit "reversed-phase"-Sorbenzien und AgNO_3 -haltigen Eluentien geometrische Isomere von offenkettigen und zyklischen Olefinen mit guter Auflösung zu trennen. Die Trenn-Effekte beruhen dabei auf π -Komplex-Wechselwirkungen zwischen dem Metallion und dem Olefin in der mobilen Phase.

Die Abbildungen 14 und 15 zeigen zwei Tomaten-Extrakt-Analysen unter nahezu gleichen Bedingungen. In Abb. 15 wurde dem Eluens lediglich ein Anteil von 15g AgNO_3 /Ltr. zuge-mischt. Es zeigt sich, daß sich die Polyen-Isomeren nahezu komplett am Ag^+ -Kontakt zersetzen. Trennmöglichkeiten mit komplexierenden Lösungsmitteln dieser Art bleiben damit der Carotinoid-Chromatographie verschlossen.

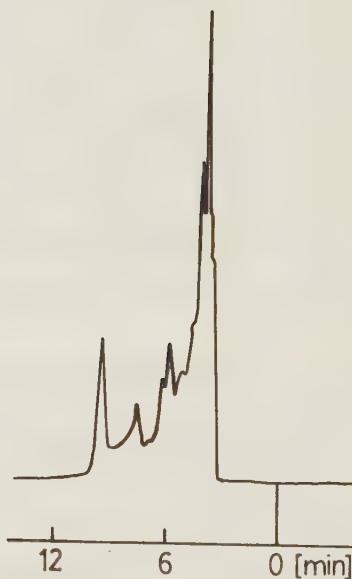
5.8.1.2 Wiederholbarkeit der isokratischen Analyse

Zur Untersuchung der Wiederholbarkeit isokratischer Carotinoid-Analysen wurde die Pigment-Lösung eines Tomaten-Extraktes unter konstanten äußeren Bedingungen sechsmal nacheinander auf die Trennsäule aufgegeben und die Substanz-Peaks bei erhöhter Schreibergeschwindigkeit registriert. Mit den Retentionsdaten von Lycopin und β -Carotin sind die Massenverteilungsverhältnisse und die jeweiligen Standardabweichungen ermittelt und in Tabelle 2 zusammengefaßt worden.

Abbildung 14:



Abbildung 15:



Trennung der Carotinoide von "Solanum lycopersicum".

Abb. 14: Säule: L = 50 cm, I.D. = 6 mm; Sorbens: NUCLEOSIL 10 C₁₈, 10 µm; mobile Phase: Aceton/Wasser = 100/5 v/v; Druck: 65 bar; Durchfluß: 2,8 ml/min; Detektor: UV 450 nm.
Abb. 15: mobile Phase: Aceton/Wasser = 100/5 v/v gesättigt mit AgNO₃ (ca. 15 g/Ltr.); sonst gleiche Bedingungen wie in Abb. 14.

Dabei ist

$$s = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^N (x_i - \bar{x})^2}{N - 1}} \quad s_{\text{rel}} = \frac{s}{\bar{x}} \cdot 100$$

Tabelle 2: (Maß für t: mm Papiervorschub bei 2 cm/min
Schreibergeschwindigkeit)

Probe	t_0	t_{R1}	t_{R2}	k'_1	k'_2
1	85,5	161,3	204,7	0,886	1,394
2	86,0	161,0	205,7	0,872	1,392
3	86,9	163,1	211,0	0,853	1,428
4	86,0	161,5	210,5	0,878	1,442
5	86,3	162,9	208,1	0,887	1,411
6	85,2	160,7	207,9	0,886	1,440
$\bar{x}$	85,98	161,75	207,98	0,877	1,418
s	0,598	1,007	2,508	0,013	0,022
s_{rel}	0,70 %	0,62 %	1,21 %	1,48 %	1,55 %

Es zeigt sich, daß mit der verwendeten Apparatur eine gute Reproduzierbarkeit der Analysen erreicht werden konnte mit relativen Standardabweichungen der k' -Werte bis zu maximal 1,5 %. Diese Genauigkeit gewährleistet bei Analysen mit unbekannten Inhaltsstoffen eine relativ zuverlässige Zuordnung zu Substanzen mit bekanntem Retentionsverhalten.

5.8.1.3 Möglichkeiten quantitativer Aussagen

Hängt die Reproduzierbarkeit von HPLC-Analysen in erster Linie von der Konstanz der Fließmittelgeschwindigkeit ab, so ist für quantitative Aussagen zusätzlich noch die Charakteristik des Proben-Dosiersystems entscheidend. Das verwendete Probenaufgabesystem Modell U6K der Fa. Waters garantiert laut Herstellerangabe eine Dosiergenauigkeit von $\pm 0,5 \%$ des Einspritzvolumens und ist damit für quantitative Analysen geeignet.

Prinzipiell stehen bei der quantitativen HPLC-Analyse von Carotinoiden zwei Methoden zur Wahl. Man kann ein Gemisch in mikropräparativem Maßstab in definierten Volumina auf die Säule aufgeben, die exakt getrennten Substanzen isolieren, spektralphotometrisch vermessen und mit Hilfe von bekannten spezifischen Extinktionskoeffizienten die Konzentration errechnen. Zum andern hat man die Möglichkeit, mit Hilfe von Reinsubstanzen Lösungen unterschiedlicher, genau eingestellter Konzentrationen zu chromatographieren und aus dem Detektorsignal nach unterschiedlichen Methoden Eichkurven zu ermitteln, die dann die Zuordnung eines zu bestimmenden Peaks aus einem Gemisch erlauben.

Beide Verfahren wurden zur Ermittlung der β -Carotin-Konzentration eines Tomaten-Extraktes herangezogen und sollen in ihrer Handhabung und Aussagegenauigkeit einander gegenübergestellt werden.

Bei der ersten Methode erfolgte die Berechnung der abso-

luten Farbstoffmengen aus der Extinktion E bei $\lambda_{\max}$ nach dem Lambert-Beerschen Gesetz:

$$E = \log \frac{I_0}{I} = \epsilon \cdot c \cdot d$$

(I_0 = Intensität des eintretenden Lichtes; I = Intensität des durchgelassenen Lichtes; ϵ = molarer Extinktionskoeffizient; d = Schichtdicke in cm; c = Konz. in Mol/Ltr.).

Bei den Carotinoiden wird meistens der Extinktionskoeffizient $E_{1\text{cm}}^{1\%}$ verwendet, der auf die Konzentration $C = 1\text{g}/100\text{cm}^3$ und auf die Schichtdicke $d = 1\text{ cm}$ bezogen ist:

$$C \left[\frac{\epsilon}{100\text{cm}^3} \right] = \frac{E}{E_{1\text{cm}}^{1\%}}$$

Daraus ergibt sich, daß eine unbekannte Menge eines Carotinoids, also $X\text{ g}$, die in $Y\text{ cm}^3$ eines Lösungsmittels gelöst sind, aus der gemessenen Extinktion E durch folgende Gleichung ermittelt werden kann:

$$X = \frac{E \cdot Y}{E_{1\text{cm}}^{1\%} \cdot 100}$$

Bedingung für die korrekte Auswertung von Extinktionswerten, die mit chromatographisch getrennten Substanzen erhalten wurden, ist die Berücksichtigung der Wiederfindungsrate. Sie ist für jedes Trennsystem charakteristisch und betrug für die eingesetzte Säule (Sorbens: NUCLEOSIL 10 C₁₈; I.D.: 6 mm; Länge: 50 cm) in Bezug auf das β -Carotin 93 %.

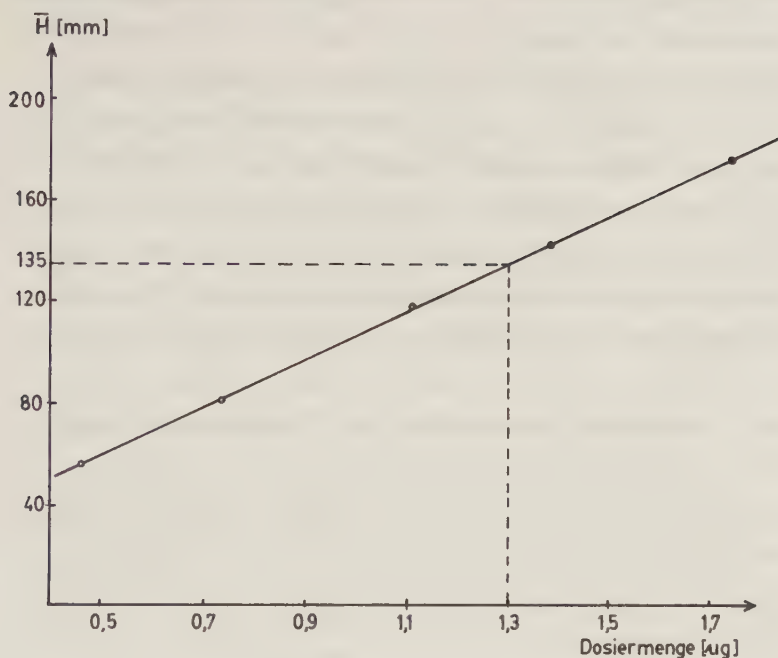
Über die Messung der Extinktion errechnete sich für den in Abb. 11 getrennten Tomaten-Extrakt pro 15 μ l Dosiervolumen eine Menge von 1,14 μ g β -Carotin ($E_{1\text{cm}}^{1\%} = 2592^{(27)}$ bei $\lambda_{\text{max}} = 449$ nm in Hexan).

Für die zweite Bestimmungsmethode wurde aus fünf Lösungen mit unterschiedlichen bekannten Konzentrationen eine Eichkurve aus den resultierenden unterschiedlichen Peak-Höhen des β -Carotins aufgestellt. Jeder notierte Wert setzte sich aus der Mittelwert-Bildung über drei Meßdaten zusammen. Die Standard-Abweichungen für die Dosiergeauigkeit sind aus der Tabelle 3 zu ersehen. Die Eichgerade zeigt die Abbildung 16.

Tabelle 3:

Probe	Dosiermenge	Peak-Höhe mm	$\bar{H}$ mm	s	s_{rel}
1	0,486 μ g/5 μ l	55 56 56,5	55,83	0,76	1,36 %
2	0,740 μ g/5 μ l	79,3 82 (75)	80,9	1,55	1,91 %
3	1,113 μ g/5 μ l	116,5 118 120	118,17	1,76	1,49 %
4	1,383 μ g/5 μ l	142 142,5 144,5	143	1,32	0,92 %
5	1,737 μ g/5 μ l	177,5 175,5 179	177,3	1,76	0,99 %
X	ermittelt: 1,30 μ g/5 μ l	136,5 134,5 134,5	135,17	1,15	0,85 %

Abbildung 16:



Aus der Peak-Höhe eines Dosiervolumens von 15 µl desselben Tomaten-Extraktes, der auch für die Bestimmungsmethode über die Extinktionsmessung verwendet wurde, leitet sich aus der Eichkurve für β -Carotin eine Dosiermenge von 1,30 µg ab.

Diesem Wert stehen die 1,14 µg aus der Extinktions-Messung gegenüber. Wohl beträgt die relative Abweichung der beiden Ergebnisse voneinander ca. 12 %, doch ist der absolute Fehler, der aus diesen beiden völlig verschiedenen Methoden resultiert, mit einer Differenz von $0,16 \cdot 10^{-6}$ g äußerst gering.

Zuverlässiger dabei ist sicher die direkte Zuordnung unbekannter Carotinoid-Konzentrationen aus dem Chromatogramm. Bei der Methode der Extinktions-Messungen ergeben sich Fehlerquellen durch die Isolierung der getrennten Substanz (Abziehen des Elutionsmittels) und auch durch die Messung der Absorption selbst, bei der noch Isomerisierung und Zersetzung eintreten können. Die direkte Auswertung des Chromatogramms ist zudem erheblich einfacher und läßt sich durch Ermittlung der Peak-Flächen anstelle der Peak-Höhen bei Benützung eines elektronischen Integrators noch schneller und genauer durchführen. Für eine in Bezug auf verschiedene Carotinoide geeichte Säule ist die analytische und zugleich quantitative Trennung innerhalb eines einzigen Arbeitsganges bei einer vergleichsweise minimalen Fehlerbreite möglich, wie sie mit den klassischen Verfahren nicht erreicht wird.

5.8.2 Carotinoide von Spinacia oleracea

In den Chloroplasten von Spinat-Blättern finden sich Carotinoide in einem Gehalt von ca. 44 mg/100 g Frischgewicht⁽⁸⁸⁾. Die Zusammensetzung der einzelnen Komponenten ist unterschiedlich beschrieben. Die Hauptbestandteile bilden jedoch in allen Fällen Lutein, Violaxanthin, Neoxanthin und β -Carotin⁽⁸⁹⁾. Von den Pigmenten, die in deutlich geringeren Mengen vorliegen, werden in einigen Fällen genannt: Zeaxanthin, Lutein-5,6-epoxid, Anthera-

xanthin, Neoxanthin Neo A und Isomere der Hauptkomponenten⁽⁹⁰⁾.

Neben der Trennung und Identifizierung wird im folgenden am Beispiel der Carotinoide von *Spinacia oleracea* die Effizienz von fünf verschiedenen "reversed-phase"-Sorbenzien getestet, Säulen mit Innendurchmessern von 2-8 mm werden einander gegenübergestellt und auf ihre Belastbarkeit hin untersucht und schließlich werden Aussagen gemacht über die Wiederholbarkeit von Elutions-Gradient-Analysen.

5.8.2.1 Trennung und Identifizierung der Carotinoide

Die isokratische Trennung der Spinat-Carotinoide gelingt nur unvollständig, unabhängig davon, welches "reversed-phase"-Sorbens auch verwendet wird. Ursache dafür bilden die großen Polaritätsunterschiede zwischen den Xanthophyllen auf der einen Seite und den Carotinen auf der anderen. Ein Beispiel für die isokratische Analyse der Spinat-Pigmente zeigt die Abbildung 17. Innerhalb von ca. 1 3/4 Stunden wird lediglich die Gruppe der Xanthophylle eluiert (Säule: NUCLEOSIL 10 C₁₈, I.D.: 4 mm, L: 30 cm). Die Co-Injektion von synthetischem β -Carotin zeigt, daß die Carotine bei dem verwendeten Eluens (Aceton/Wasser=100/50 v/v) auf der Säule zurückbleiben.

Die Anwendung von Gradienten zeigen die Abbildungen 18 und 19. Innerhalb von 60 bzw. 70 Minuten werden sämtliche Carotinoide komplett eluiert. Die unterschiedlichen Gradienten-

profile (gestrichelte Linie) zeigen, daß zwei verschiedene Mischkammer-Volumina eingesetzt wurden. Die 15 ml-Kammer liefert im Chromatogramm der Abb. 18 eine alles in allem bessere Trennung in Bezug auf Analysenzeit und Peak-Auflösung als die 52 ml-Mischkammer, die bei der Analyse der Abb. 19 einen flacheren Gradienten wirksam werden läßt. Allenfalls die Auflösung der beiden Peaks 7 und 8 ist hier etwas günstiger. Bei beiden Chromatogrammen blieben die äußeren Trennbedingungen gleich; der Gradient verlief jeweils von der Ausgangszusammensetzung Aceton/Wasser=100/40 nach Aceton/Wasser=100:5. Dabei wurde also nur der Gehalt einer Komponente eines binären Gemisches variiert. Besonders für problemlose Reproduzierbarkeiten sind solche möglichst einfach gehaltenen Analysenbedingungen von großem Wert. Die Trennung der in Abb. 18 bezifferten neun Hauptkomponenten ist sowohl für analytische als auch für präparative Zwecke ausreichend; sie kann in Bezug auf einzelne Komponenten durch Variieren des Elutionsgemisches oder durch Verschieben des Gradienten-Startes bei Bedarf noch weiter optimiert werden.

Bei der Identifizierung der Carotinoide fällt die Zuordnung der Hauptkomponenten β -Carotin, Lutein, Violaxanthin und Neoxanthin relativ leicht. Diese Pigmente besitzen in der beschriebenen Reihenfolge gegenüber polaren Sorbenzien steigende Adsorptions-Affinitäten⁽⁹¹⁾ und sollten an "reversed-phase"-Systemen in umgekehrter Elutionsordnung im Chromatogramm erscheinen. Die UV-Spektren der isolierten Substanzen von den Peaks 2,3,6 und 9 bestätigen diese

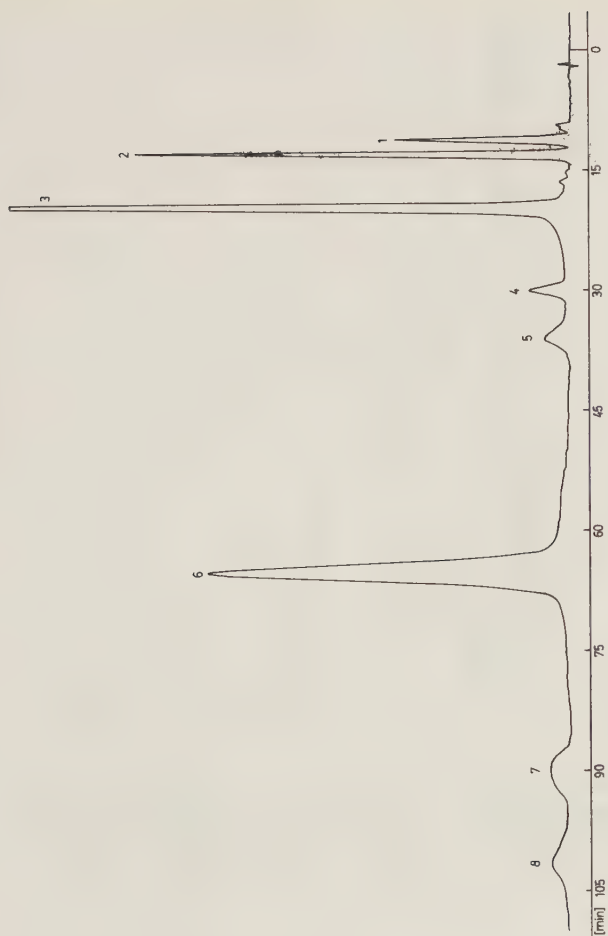
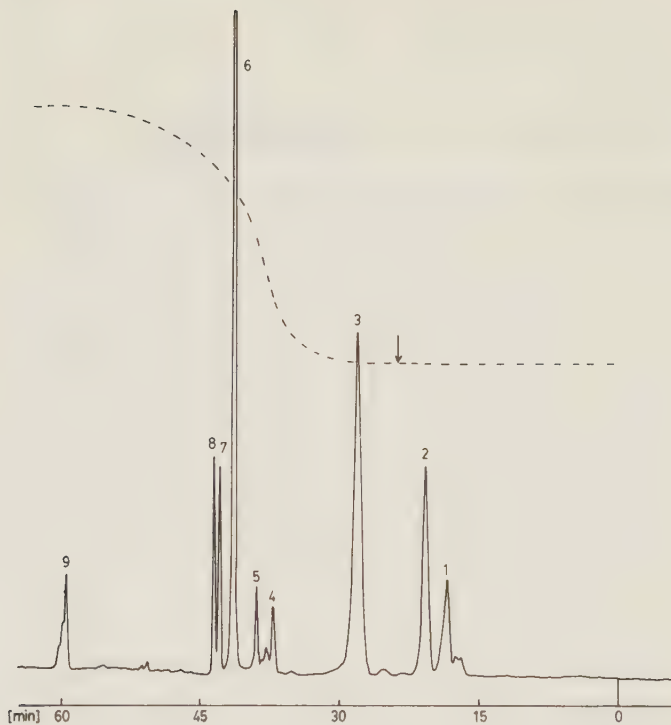


Abbildung 17: Trennung der Carotinoide von "*Spinacia oleracea*".

Säule: L = 30 cm, I.D. = 4 mm; Sorbens: NUCLEOSIL 10 C₁₈, 10 µm; mobile Phase: Aceton/Wasser = 100/50 v/v; Druck: 130 bar; Durchfluß: 1,6 ml/min; Detektor: UV 475 nm.

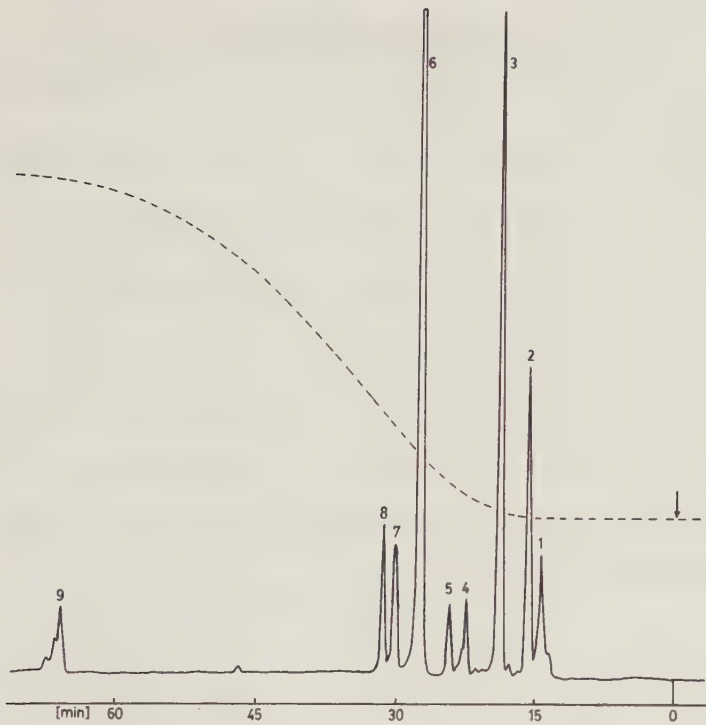
Abbildung 18:



Trennung der Carotinoide von "*Spinacia oleracea*".

Säule: L = 50 cm, I.D. = 6 mm; Sorbens: NUCLEOSIL 10 C₁₈, 10 µm; mobile Phase: Gradient von Aceton/Wasser = 100/40 nach 100/5 v/v, Mischkammervolumen: 15 ml; Druck: 82 bar; Durchfluß: 1,6 ml/min; Detektor: UV 450 nm.

Abbildung 19:



Trennung der Carotinoide von "*Spinacia oleracea*".

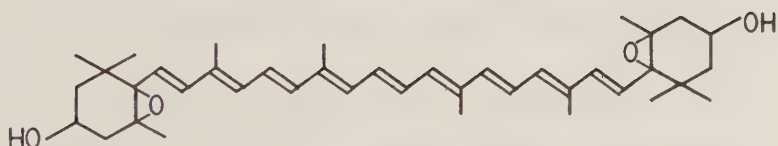
Bedingungen wie in Abb. 18. Einzige Änderung: Mischkammer-
volumen = 52 ml.

Zuordnung.

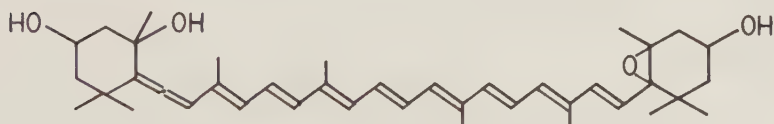
Tabelle 4:

	$\lambda_{\max}$ (in Hexan) [nm]			Autor
<u>β-Carotin</u>	s. Tab. 1			
<u>Peak 9</u> (Abb.18)	424	448	474	eigene Messung
<u>Lutein</u>	420	445	476	A.Hager et al. ⁽⁸³⁾
	420	447	477	T.W.Goodwin ⁽¹⁹⁾
	419	446	475	T.R.Parsons ⁽⁹²⁾
	422	445	477	T.R.Parsons ⁽⁹²⁾
	420	445	475	D.J.Chapman ⁽⁹³⁾
<u>Peak 6</u> (Abb.18)	421	446	475	eigene Messung
<u>Violaxanthin</u>	416	440	470	A.Hager et al. ⁽⁸³⁾
	417,5	442,5	472	H.H.Strain ⁽⁹⁴⁾
		443	472	T.W.Goodwin ⁽¹⁹⁾
		443	476	T.R.Parsons ⁽⁹²⁾
<u>Peak 3</u> (Abb.18)	417,5	441	470	eigene Messung
<u>Neoxanthin</u>	414	438	467	A.Hager et al. ⁽⁸³⁾
		436	467	T.R.Parsons ⁽⁹²⁾
	415	437	466	B.H.Davis ⁽⁹⁵⁾
	416	437	466	A.K.Stöbhart et al. ⁽⁹⁶⁾
<u>Peak 2</u> (Abb.18)	413	437	466	eigene Messung

Violaxanthin:



Neoxanthin:



Aus dem Chromatogramm der Abb. 19 ist deutlich zu ersehen, daß neben dem Haupt-Peak 9 des β -Carotins noch zwei Isomere auftreten. J.P. Sweeney et al.⁽⁷⁰⁾ beschreiben neben dem all-trans Isomeren noch das Vorkommen von Neo- β -Carotin B und U im Spinat, die man diesen unvollständig abgetrennten Begleitsubstanzen des Peak 9 zuordnen kann.

Schwieriger gestaltet sich die Identifizierung der übrigen Substanz-Peaks 1, 4, 5, 7 und 8. Einmal liegen sie in kleineren Mengen vor, zum andern existieren, wie schon erwähnt, in der Literatur unterschiedliche Angaben über die Zusammensetzung der Pigmente, die sich nur in kleineren prozentualen Anteilen im Spinat finden.

Von den Peaks 1 und 4 konnten keine Aufschlüsse über die Natur der zugrundeliegenden Substanzen erhalten werden. Es war bei der Untersuchung verschiedener Blatt-Extrakte von *Spinacia oleracea* lediglich festzustellen, daß in einigen

Chargen diese Komponenten fehlten (vgl. Abb. 20) und daß das Pigment 7 zuweilen nur in sehr kleinen Anteilen vorkommt.

Von minimalen Mengen der Substanz aus Peak 5 konnte ein UV-Spektrum aufgenommen werden, das in etwa die gleiche Lage der Extinktionsmaxima zeigt, wie das Neoxanthin (vgl. Tab. 4) und Neoxanthin Neo A:

Tabelle 5:

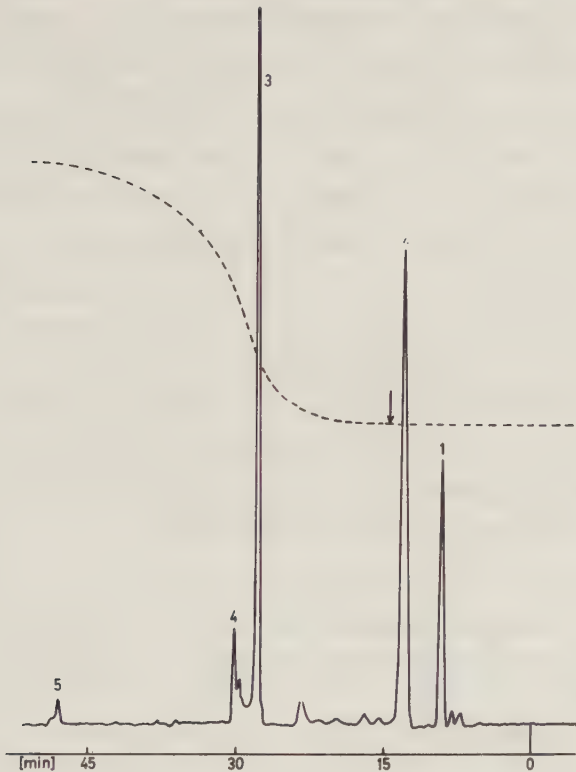
	$\lambda_{\max}$ (in Hexan)			Autor
<u>Neoxanthin Neo A</u>	416	439	468	A.Hager et al. ⁽⁸³⁾
<u>Peak 5</u> (Abb. 18)		437	465	eigene Messung

Das Retentionsverhalten und die Lage der maximalen Absorptionen deuten auf das Vorliegen von Neoxanthin Neo A hin, das nach A.Hager et al.⁽⁸³⁾ ein Isomeres des Neoxanthins mit unbekannter Struktur darstellt und in den Spinat-Chloroplasten auch beschrieben ist.

Der Peak 7 in der Abb. 18 ist mit großer Wahrscheinlichkeit einem Isomeren des Luteinepoxids zuzuordnen. Es stehen dabei mit Isolutein und Taraxanthin zwei Stoffe zur Diskussion, deren exakte Struktur unbekannt ist und über deren wechselseitigen Identitäten Unklarheit besteht⁽⁹⁷⁾. F.H. Foppen⁽⁶⁴⁾ beschreibt sie als unterschiedliche Verbindungen mit verschiedenen physikalischen Eigenschaften.

Die Tabelle 6 zeigt den Vergleich der bei Peak 7 isolierten Komponente in der UV-Absorption mit Isolutein und Taraxanthin.

Abbildung 20:



Trennung der Carotinoide von "*Spinacia oleracea*".

Säule: L = 30 cm, I.D. = 4 mm; Sorbens: NUCLEOSIL 10 C₁₈, 10 µm; mobile Phase: Gradient von Aceton/Wasser = 100/50 nach 100/12 v/v, Mischkammervolumen: 15 ml; Druck: 118 bar; Durchfluß: 1,6 ml/min; Detektor: UV 450 nm.

(1) Neoxanthin, (2) Violaxanthin, (3) Lutein, (4) Lutein-5,6-epoxid, (5) β-Carotin + Isomeres.

Tabelle 6:

	$\lambda_{\max}$ (in Hexan) [nm]			Autor
<u>Isolutein</u>	420	445	470	L.R.G.Valadon et al. ⁽⁹⁸⁾
		442	471	T.W.Goodwin ⁽¹⁹⁾
<u>Taraxanthin</u>	417,5	442	472	T.W.Goodwin ⁽¹⁹⁾
	418	440	470	A.Baccarini et al. ⁽⁹⁹⁾
<u>Peak 7</u> (Abb.18)	419	442	468	eigene Messung

Dieser Vergleich und die Beachtung des Retentionsverhaltens bestätigen die Vermutung, daß es sich bei dem Carotinoid von Peak 7 um ein Isomeres des Luteinepoxids handelt.

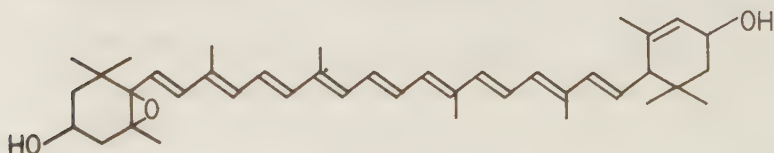
Das Lutein-5,6-epoxid selbst wird mit Peak 8 eluiert.

Die UV-Daten sind in Tabelle 7 zusammengefaßt.

Tabelle 7:

	$\lambda_{\max}$ (in Hexan) [nm]			Autor
<u>Luteinepoxid</u>	416	439	469	A.Hager et al. ⁽⁸³⁾
<u>Peak 8</u> (Abb. 18)	417	439	468	eigene Messung
<u>Luteinepoxid</u> (synth.)	417	440	468	eigene Messung

Lutein-5,6-epoxid:



Bei der Adsorptions-Chromatographie wird das Luteinepoxid an Al_2O_3 stärker retardiert als Lutein, an einer Dünnschicht aus CaCO_3 , MgO und Ca(OH)_2 dagegen schwächer als dieses. Da die Einordnung nach den Richtlinien der Polarität somit nicht eindeutig ist, wurde ein zusätzlicher Identitäts-Beweis erbracht.

Nach einer Methode von P. Karrer⁽¹⁰⁰⁾ ist es möglich, Lutein in Form seines Diacetats mit Perphthalsäure in ca. 5 %-iger Ausbeute in das Lutein-5,6-epoxid überzuführen. Nach diesem Syntheseweg wurde die Reaktionsmischung im Chromatogramm dem eingesetzten Lutein gegenübergestellt und es konnte deutlich die Vergrößerung desjenigen Peaks festgestellt werden, der im Chromatogramm von Abb. 18 dem vermuteten Luteinepoxid entspricht. Die Substanz dieses Peaks wurde isoliert und spektralphotometrisch vermessen; die Werte der ermittelten Absorptionsmaxima decken sich mit denen, die für Luteinepoxid in der Literatur beschrieben und die für die Substanz von Peak 8 erhalten worden sind (vgl. Tab. 7).

Zusammenfassend kann für die näher untersuchten Peaks aus dem Chromatogramm der Abb. 18 folgende Zuordnung getroffen werden:

- Peak 2 : Neoxanthin
- Peak 3 : Violaxanthin
- Peak 5 : evtl. Neoxanthin Neo A
- Peak 6 : Lutein
- Peak 7 : Luteinepoxid-Isomeres
(Taraxanthin, Isolutein)

Peak 8 : Lutein-5,6-epoxid

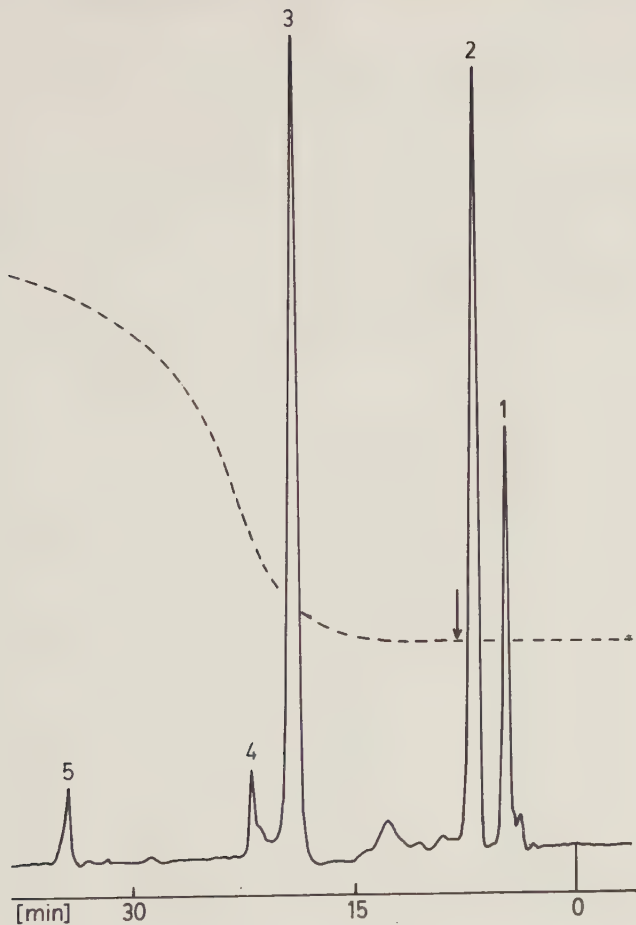
Peak 9 : β -Carotin und 2 Isomere

5.8.2.2 Untersuchung von Trennwirkung und Belastbarkeit an Säulen mit verschiedenen Innendurchmessern

Um den Einfluß vom Innendurchmesser einer Säule auf die Trennwirkung zu erfassen, wurden mit dem Sorbens NUCLEOSIL 10 C₁₈ Trennsäulen mit 2, 4, 6 und 8 mm I.D. hergestellt und am Beispiel der Carotinoide des Spinats in ihrem Leistungsvermögen miteinander verglichen. Die Abbildungen 18 und 20 zeigen, daß in der Trennschärfe zwischen den Säulen mit 4 und 6 mm I.D. kaum Unterschiede zu registrieren sind. Bei der 2 mm I.D.-Säule (L = 30 cm) wird die Auflösung zwischen eng benachbarten Peaks deutlich schlechter (s. Abb. 21). Zudem machte sich bei dieser Säule nachteilig bemerkbar, daß für einen Durchfluß von 1 ml/min bereits ein Säulenvordruck von 180 bar erforderlich war. Die Säule mit 8 mm I.D. brachte etwa gleich gute Trennergebnisse wie die 4 und 6 mm I.D.-Säulen (Abb. 22). Hier ist jedoch die Probenaufgabe nicht ganz unproblematisch, da die "punktförmige" Dosierung auf die Mitte des Säulenkopfes zu Bandenverbreiterung führen kann. Es empfiehlt sich der Einbau eines Verteilungsstückes, das die gleichmäßige Substanzauftragung über die ganze Querschnittsfläche der Kolonne ermöglicht.

Im allgemeinen erwies sich die Säule mit 6 mm I.D. bei der Verwendung von 10 μ m-Teilchen als Sorbens am vorteilhaftesten.

Abbildung 21:

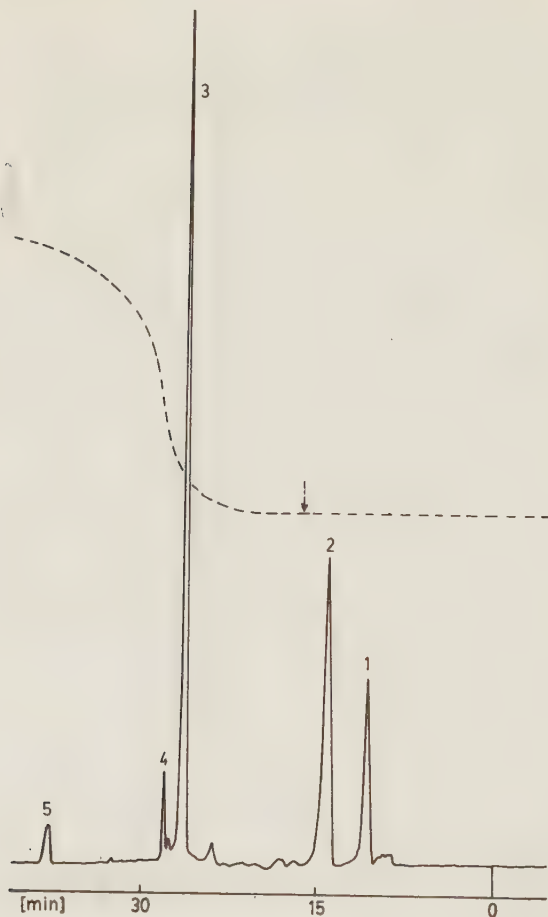


Trennung der Carotinoide von "*Spinacia oleracea*".

Säule: L = 30 cm, I.D. = 2 mm; Sorbens: NUCLEOSIL 10 C₁₈, 10 µm; mobile Phase: Gradient von Aceton/Wasser = 100/50 nach 100/5 v/v, Mischkammervolumen: 15 ml; Druck: 178 bar; Durchfluß: 1 ml/min; Detektor: UV 450 nm.

(1) Neoxanthin, (2) Violaxanthin, (3) Lutein, (4) Lutein-5,6-epoxid, (5) β-Carotin.

Abbildung 22:



Trennung der Carotinoide von "Spinacia oleracea".

Säule: L = 30 cm, I.D. = 8 mm; Sorbens: NUCLEOSIL 10 C₁₈,
10 µm; mobile Phase: Gradient von Aceton/Wasser =
100/40 nach 100/5 v/v, Mischkammervolumen: 15 ml; Druck:
93 bar; Durchfluß: 3 ml/min; Detektor: UV 450 nm.

Diese Säule gestattete gute Auflösung und kurze Trennzeiten für rein "analytische" Nachweise und ließ gleichzeitig aufgrund ihrer hohen Belastbarkeit im Vergleich zu den Säulen mit kleineren Durchmessern auch mikropräparative Trennungen zu.

Die Probenmenge, bei welcher noch 90 % der maximal möglichen Bodenzahl erreicht wird, gilt definitionsgemäß als Belastbarkeit. Für das in Abb. 11 beschriebene Trennsystem (Säule: I.D.=6 mm, L=50 cm, Sorbens NUCLEOSIL 10 C₁₈) errechnet sich in Bezug auf β -Carotin danach eine Probenmenge von ca. $7 \cdot 10^{-6}$ g.

Bei präparativen Arbeiten kann dieser Wert überschritten werden, sofern die Auflösung der Peaks genügend groß ist, daß sich auch bei größerer Belastung keine Überlappungen ergeben. So ist es z. B. noch gut möglich, die in Abb. 10 gezeigte Trennung für präparative Zwecke so zu optimieren, daß Substanzmengen bis zu einigen Milligramm Lycopin und β -Carotin eingesetzt werden können. Weit schwieriger stellt sich jedoch das Problem in der Abb. 11 am Beispiel des Tomaten-Extraktes dar, wo zwischen den Hauptkomponenten noch ein kleinerer Substanz-Peak auftritt. Er könnte bei einer Überlastung der Säule nicht mehr aufgelöst werden und würde sich in den isolierten Proben als Verunreinigung finden. Dieser Fall ist kennzeichnend für präparative Trennungen von Carotinoid-Pigmenten aus pflanzlichen oder tierischen Organismen, denn hier ist es in der Regel nicht mehr möglich, auf Kosten der Auflösung die Probenmenge zu steigern. Inwieweit

bei älteren Arbeiten in diesem Maße Rücksicht auf die Reinheit der Substanzen genommen worden ist, sei dahingestellt.

War bei dieser Arbeit die isolierte Substanzmenge von höchstens 10 µg pro Analyse noch sehr klein, so wird es durch Anwendung neuester präparativer HPLC-Säulen mit großen Füllvolumina bald möglich sein, auch im Bereich von einigen Milligramm noch gut aufgelöste Proben zu isolieren.

5.8.2.3 Vergleich von verschiedenen "reversed-phase"-Sorbenzien

Für den Einsatz in der Hochdruck-Flüssigkeits-Chromatographie wird eine ganze Palette verschiedener "reversed-phase"-Sorbenzien angeboten. Sie unterscheiden sich in Teilchenform, Teilchengröße, Porosität und in der organischen Phase, mit der die Hydrophobierung durchgeführt worden ist. Neben dem NUCLEOSIL 10 C₁₈ sind drei weitere Sorbenzien eingesetzt und auf ihre Trennwirkung am Spinat-Extrakt untersucht worden.

Von den sog. "Porous Layer Beads" wurden Perisorb RP (Fa. Merck) und CORASIL C₁₈ (Fa. Waters) verwendet. Bei diesen Teilchen ist ein inerte Kern von einer porösen Festschicht umhüllt, die in ihrer Radialausdehnung weniger als 1 µm mißt. Die einzelnen Teilchen haben Kugelgestalt und liegen in Siebfraktionen zwischen 37 und 50 µm vor. In der äußeren, mit C₁₈H₃₇-Kohlenwasserstoff-Ketten hydrophobierten

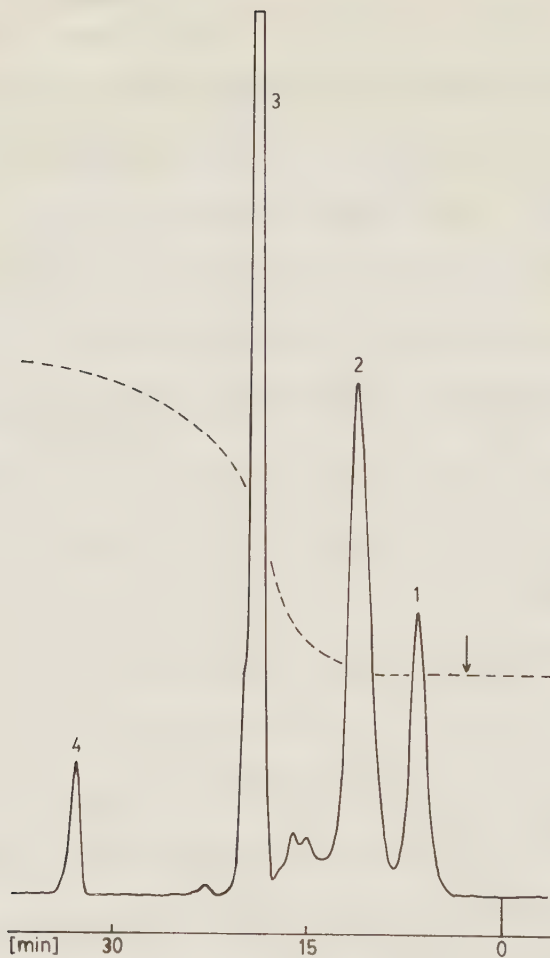
Schale erfolgen die chromatographischen Austauschvorgänge aufgrund der gegenüber einem durch und durch porösen Korn wesentlich kürzeren Diffusionswege besonders schnell. Unter sonst gleichen Bedingungen erreicht man gegenüber dem total porösen Material eine ca. 10-fach höhere Analysengeschwindigkeit. Die Belastbarkeit ist aber wegen der geringeren Gesamtoberfläche noch entsprechend geringer.

Die Abbildungen 23 und 24 zeigen, daß die Gradienten-Trennung der Spinat-Carotinoide bei einem Durchfluß von nur 1,2 bzw. 1,4 ml/min an CORASIL C₁₈- und Perisorb RP-Säulen (I.D.=2 mm, L=1 m) bereits nach ca. 36 Minuten beendet ist. Deutlich ist aber an den breiten Peak-Formen zu sehen, daß die Trennleistung dieser Sorbenzien sehr beschränkt ist, eine Folge der Größe der Teilchen (37 - 50 µm). Für Peak 1 errechnen sich Bodenzahlen von N = 120 (Abb. 24) und N = 106 (Abb. 23) pro Meter Säule.

Die vier Hauptinhaltsstoffe des Extraktes, Neoxanthin (1), Violaxanthin (2), Lutein (3) und β-Carotin (4), eluieren in derselben Reihenfolge wie an der NUCLEOSIL 10 C₁₈-Säule. Die Peaks 7 und 8 des Chromatogramms in Abb. 18 sind an der Perisorb RP-Säule überhaupt nicht und an der CORASIL C₁₈-Säule nur als schwache Schulter zu erkennen. Ebenso fehlt die Registrierung der Isomeren des β-Carotins.

Ein durch und durch poröses Trennmateriale, dessen Silicagel-Oberfläche mit C₈H₁₇-Gruppen hydrophobiert ist, stellt das Merckosorb RP 8 dar. Dieses Sorbens liegt zudem in unregelmäßigen Partikelformen vor (mittlerer Teilchendurchmesser:

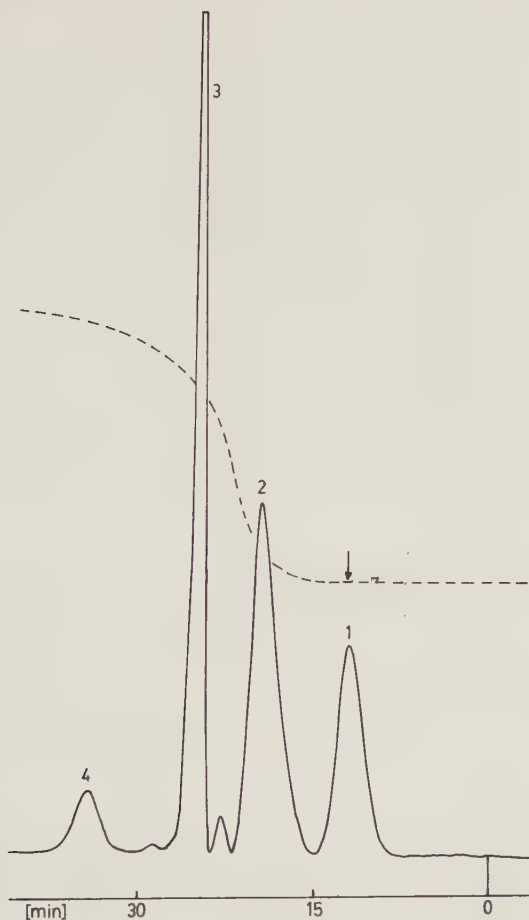
Abbildung 23:



Trennung der Carotinoide von "Spinacia oleracea".

Säule: L = 100 cm, I.D. = 2 mm; Sorbens: CORASIL C₁₈,
37-50 µm; mobile Phase: Gradient von Aceton/Wasser 100/0,
100/70 nach 100/10, Mischkammervolumen: 15 ml; Druck:
100 bar; Durchfluß: 1,2 ml/min; Detektor: UV 475 nm.

Abbildung 24:



Trennung der Carotinoide von "*Spinacia oleracea*".

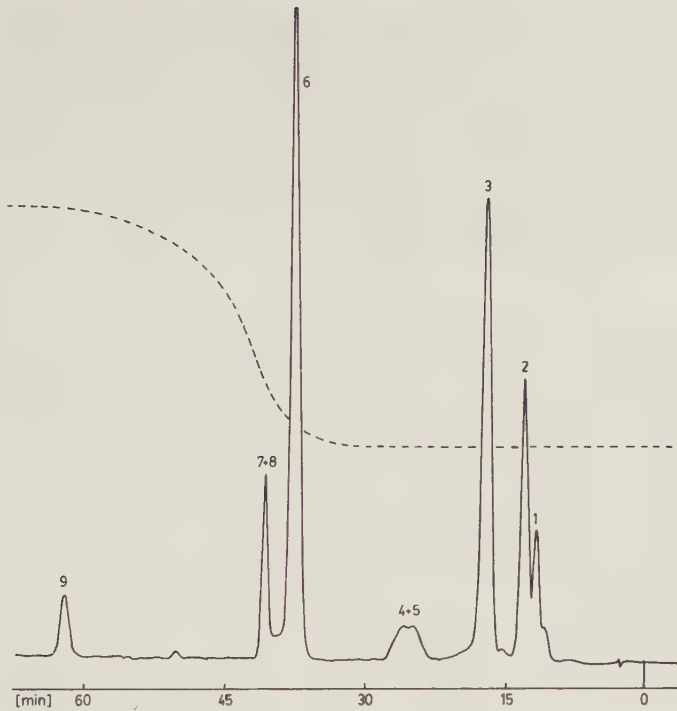
Säule: L = 100 cm, I.D. = 2 mm; Sorbens: Perisorb RP,
37-50 μ m; mobile Phase: Gradient von Aceton/Wasser =
100/130 nach 100/30 v/v, Mischkammervolumen: 15 ml;
Druck: 105 bar; Durchfluß: 1,4 ml/min; Detektor: UV 475 nm.

10 μm). Es erschwert damit eine gute und reproduzierbare Säulenpackung. In der Abb. 25 ist die Gradient-Analyse der Spinat-Carotinoide an einer Merckosorb RP 8-Säule (I.D.=4 mm, L=30 cm) dargestellt. Für den Peak 3 (Violaxanthin) berechnet sich eine Bodenzahl von $N = 1460$; das ist ein für 10 μm -Material relativ niedriger Wert. Zum Vergleich dazu zeigt der Violaxanthin-Peak in der Abb. 20 (Peak 2), der eine Bodenzahl von $N = 2870$ aufweist, daß die Trennleistung der NUCLEOSIL 10 C_{18} -Säule mit denselben äußeren Maßen und Teilchengrößen nach den errechneten Werten nahezu doppelt so gut ist. Für die demonstrierte Trennung hat das zur Folge, daß die Peak-Paare 4 und 5 sowie 7 und 8 aus Abb. 13 mit der Merckosorb RP 8-Säule nicht mehr aufgelöst werden können.

Die Elutionsreihenfolge von Carotinoiden ist identisch bei Phasen, an deren Oberfläche Oktyl- und Oktadezylgruppen chemisch gebunden sind. Ein Unterschied besteht lediglich darin, daß die Retentionszeiten bei gleichen äußeren Bedingungen für viele Substanzen an C_{18} -Materialien etwa doppelt so lang sind, wie an den C_8 -Phasen.

Die weitaus besten Ergebnisse wurden mit dem Sorbens NUCLEOSIL 10 C_{18} erzielt. Es besteht aus völlig porösen, kugelförmigen 10 μm -Teilchen, mit denen sich erstaunlich reproduzierbar Hochleistungs-Trennsäulen herstellen lassen. Es konnten damit in 6 mm I.D.-Säulen Bodenzahlen von $N > 27\ 000$ pro Meter Säule erhalten werden. Wegen der zudem guten Belastbarkeit wurde dieses Trennmateriale sowohl für

Abbildung 25:



Trennung der Carotinoide von "*Spinacia oleracea*".

Säule: L = 30 cm, I.D. = 4 mm; Sorbens: Merckosorb RP 8, 10 μ m; mobile Phase: Gradient von Aceton/Wasser = 100/60 nach 100/20 v/v, Mischkammervolumen: 15 ml; Druck: 90 bar; Durchfluß: 1,1 ml/min; Detektor: UV 450 nm.

analytische als auch für mikropräparative Trennungen vor allen anderen bevorzugt verwendet.

5.8.2.4 Wiederholbarkeit der Elutions-Gradient-Analysen

Zur Beschreibung der Wiederholbarkeit von Analysen, die mit einem Elutions-Gradienten erstellt wurden, sollen k-Werte dienen, die sich aus den Retentionsdaten der einzelnen Substanzen errechnen lassen.

$$k = \frac{t_R - t_0}{t_0}$$

Sie sind nicht mit dem Massenverteilungsverhältnis k' identisch, da dieses nur für konstante äußere Parameter während der Trennung definiert ist. Während der Gradienten-Elution ändern sich aber Druck, Durchfluß und natürlich auch die Elutionsmittelzusammensetzung. Die benützten k-Werte sind demnach rein fiktive Anhaltspunkte zur Charakterisierung der Wiederholbarkeit der durchgeführten Gradient-Analysen eines Spinat-Extraktes.

Prinzipiell bestehen zwei Möglichkeiten zur Darstellung von k-Werten dieser Art. Einmal in der üblichen Form, bei der in die obige Gleichung t_R als Zeitdauer zwischen Analysenbeginn und dem Erscheinen des Peak-Maximums der zu bestimmenden Substanz eingeht ($=t_{R1}$). Zum andern kann man für t_R diejenige Zeit zur Berechnung benützen, die zwischen dem Beginn des Gradienten-Laufes (in den Abbildungen jeweils durch Pfeil markiert) und dem Auftreten des Peak-Maximums

vergeht ($=t_{R2}$). Für diesen Fall geht also die Dauer der isokratischen Elution bis zum Anfang des Gradienten nicht in die Berechnung ein. De facto ist hier die Polarität des Elutionsmittels das bestimmende Maß für t_R .

Die Analyse, die in Abb. 20 dargestellt ist, wurde fünfmal wiederholt. In Tabelle 8 sind für die Peaks 1 und 2 im isokratischen Bereich und für die unter Gradienten-Einfluß eluierten Peaks 3-6 die nach den beiden verschiedenen Methoden ermittelten k-Werte zusammengefaßt.

Tabelle 8:

Peak-Nr.		1	2	3	4	5	6
Analyse							
1	k_1	2,35	3,49	5,63	6,12	6,47	10,07
	k_2	-	-	1,55	2,02	2,39	5,20
2	k_1	2,37	3,59	5,90	6,35	6,78	9,63
	k_2	-	-	1,47	1,90	2,34	5,20
3	k_1	2,40	3,52	5,71	6,16	6,55	8,63
	k_2	-	-	1,58	2,03	2,42	5,31
4	k_1	2,40	3,53	5,84	6,37	6,71	10,37
	k_2	-	-	1,56	2,08	2,45	5,63
5	k_1	2,38	3,57	(5,45)	(5,85)	(6,24)	(11,20)
	k_2	-	-	(1,40)	(1,75)	(2,15)	(5,16)
	k_1	2,38	3,54	5,77	6,25	6,63	9,67
	k_2	-	-	1,54	2,01	2,40	5,34
	s_1	0,02	0,04	0,12	0,13	0,14	0,76
	s_2	-	-	0,05	0,07	0,05	0,20
	s_{1rel}	0,88 %	1,13 %	2,08 %	2,08 %	2,11 %	7,86 %
	s_{2rel}	-	-	3,25 %	3,48 %	1,96 %	3,75 %

Wenn die Durchmischung der Gradienten-Kammer nicht voll ausreichend gewährleistet ist, so liegen die k -Werte für die unter dem Einfluß des Gradienten eluierten Peaks deutlich außerhalb der Toleranz der Meßreihe. Das ist bei Analyse 5 der Fall, deren Meßdaten für die Peaks 3 - 6 zur Berechnung der Mittelwerte und Standardabweichungen nicht berücksichtigt wurden.

Die Ergebnisse zeigen, daß die Auswertung der Retentionsdaten, bei der t_R auf den Beginn der Analyse bezogen ist, bis zu k -Werten von etwa 6 aufgrund kleinerer relativer Standardabweichungen günstiger ist, während bei sehr spät eluierenden Peaks mit $k > 6$ der Bezug von t_R auf den Zeitpunkt der Zumischung des zweiten Elutionsmittels vorteilhafter ist. Die relativen Standardabweichungen von ca. 1 % für die k' -Werte der isokratisch eluierten Peaks 1 und 2 decken sich mit den Ergebnissen, die in Tab. 2 für die Wiederholbarkeit der Analyse von Pigmenten des Tomaten-Extraktes erhalten worden sind. Die typischen Standardabweichungen für k -Werte der im Gradienten-Einfluß eluierten Peaks von ca. 2 - 3 % zeigen, daß mit der verwendeten Einrichtung der hochdruckseitigen Gradienten-Mischung eine gute Wiederholbarkeit der Analysen erreicht werden kann. Man ist damit in der Lage, unbekannte Stoffe mit einer Genauigkeit von $k < 0,1$ den Werten einer bekannten Analyse zuzuordnen.

5.0.3 Herbstcarotinoide von Acer platanoides

Untersuchungen an grünen und vergilbten Blättern des Ahorns haben gezeigt, daß Art und Menge der vorkommenden Carotinoid-Pigmente stark von der Jahreszeit abhängen, in welcher die Blätter geerntet werden⁽¹⁰¹⁾⁽¹⁰²⁾. Aus einem Kilogramm des Materials lassen sich im Durchschnitt 800 mg Carotinoide isolieren. Während der Gehalt in grünen Partien der Blätter Ende Oktober deutlich abnimmt, wächst er in den gelben Teilen stark an. Es wird vermutet, daß beim Vergilbungsprozess keine Neubildung von Carotinoiden erfolgt, sondern daß sich die Herbstcarotinoide aller Wahrscheinlichkeit nach aus den Sommercarotinoiden durch Umbau bilden. W. Eichenberger et al.⁽¹⁰²⁾ haben gezeigt, daß dieser Umbau im wesentlichen in einer Veresterung hydroxylierter Carotinoide besteht. Sie widerlegten die Auffassung von P. Karrer und O. Walker⁽¹⁰³⁾, die Herbstxanthophylle bestünden aus Bruchstücken der Sommercarotinoide. Interessant ist noch die Tatsache, daß Carotin-Kohlenwasserstoffe, die in den Sommerblättern in einem Anteil von ca. 24 % der Pigmente vorliegen⁽¹⁰⁴⁾, in den herbstlich gefärbten Blättern nur noch als Spuren nachzuweisen sind. Sie sind vermutlich durch Oxidation in Xanthophylle umgewandelt worden.

Als Hauptbestandteile der Herbst-Pigmente sind beschrieben: Neoxanthin, Violaxanthin, Lutein, Luteinepoxid und Kryptoxanthin.

Neben der Trennung und Identifizierung der Herbstcarotinoide von *Acer platanoides* soll im folgenden Kapitel noch

die Zersetzlichkeit der Carotinoide während der HPLC-Analyse untersucht werden.

5.8.3.1 Trennung und Identifizierung der Carotinoide

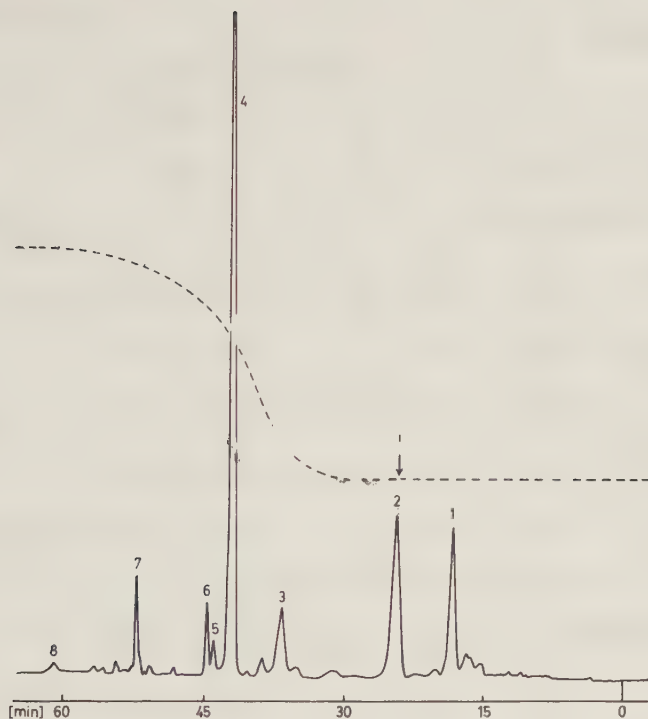
Da ein großer Teil der Pigmente des Ahorns identisch ist mit denen von Spinat-Blättern, hat man es relativ leicht, bei der Benützung von identischen Trennsystemen aufgrund von Retentionsdaten Zuordnungen zu treffen. Die Abbildung 26 zeigt die Trennung der Carotinoide von gelben Ahornblättern, die Mitte Oktober (1975) geerntet wurden. Aus einem Vergleich mit der Spinat-Analyse in Abb. 20, die mit der gleichen Säule unter gleichen Trennbedingungen erstellt wurde, sind zuzuordnen:

Peak 1: Neoxanthin, Peak 2: Violaxanthin, Peak 4: Lutein, Peak 5: Taraxanthin bzw. Isolutein, Peak 6: Luteinoxid, Peak 8: β -Carotin. Durch Absorptionsspektren wurde die Richtigkeit dieser Zuordnung für die Peaks 1, 2, 4, 5 und 6 nachgewiesen.

Tabelle 9:

$\lambda_{\max}$ (in Äthanol) [nm] Autor				
<u>Neoxanthin</u>	415	438	467	A.Hager et al. ⁽⁸³⁾
	414	437	466	A.Hager ⁽¹⁰⁵⁾
	417	438	467	N.J.Krinsky et al. ⁽¹⁰⁶⁾
<u>Peak 1</u> (Abb.26)	414,5	437,5	465,5	eigene Messung

Abbildung 26:



Trennung der Carotinoide von "*Acer platanoides*".

Säule: L = 50 cm, I.D. = 6 mm; Sorbens: NUCLEOSIL 10 C₁₈, 10 µm; mobile Phase: Gradient von Aceton/Wasser = 100/40 nach 100/5 v/v, Mischkammervolumen: 15 ml; Druck: 95 bar; Durchfluß: 1,6 ml/min; Detektor: UV 450 nm.

Tabelle 9 (Fortsetzung):

	λ_{max} (in Äthanol) [nm]			Autor
<u>Violaxanthin</u>	417	441	471	A.Hager et al. ⁽⁸³⁾
	417,5	442,5	471,5	P.Karrer et al. ⁽⁶⁸⁾
	420	441	471	B.H.Davis ⁽³⁰⁾
<u>Peak 2</u> (Abb.26)	419	441	469,5	eigene Messung
<u>Lutein</u>	422	446	475	A.Hager et al. ⁽⁸³⁾
	422	446	474	A.Hager ⁽¹⁰⁵⁾
<u>Peak 4</u> (Abb.26)	421	445	473	eigene Messung
<u>Isolutein</u>	417	442	471	F.B.Jungalwala et al. ⁽¹⁰⁷⁾
<u>Taraxanthin</u>	416	442	471	B.H.Davis ⁽³⁰⁾
<u>Peak 5</u> (Abb.26)	419	445	471	eigene Messung (in sehr schwacher Konz.)
<u>Luteinepoxid</u>	416	440	469	A.Hager et al. ⁽⁸³⁾
	418	442	471	B.H.Davis ⁽³⁰⁾
		445	473	P.Karrer et al. ⁽⁶⁸⁾
<u>Peak 6</u> (Abb.26)		443	470	eigene Messung (in sehr schwacher Konz.)

Die isolierte Substanzmenge von Peak 3 war zu gering, um ein UV-Spektrum anfertigen zu können. Durch Zumischen mit synthetischer Reinsubstanz konnte aber die Identität mit B-Carotin nachgewiesen werden.

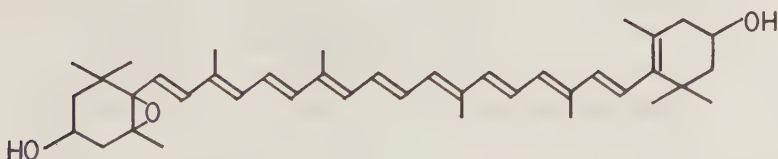
Für die Peaks 3 und 7 deuten die Absorptionsmessungen der

isolierten Substanzen auf die Pigmente Antheraxanthin und α -Kryptoxanthin hin (Tab. 10).

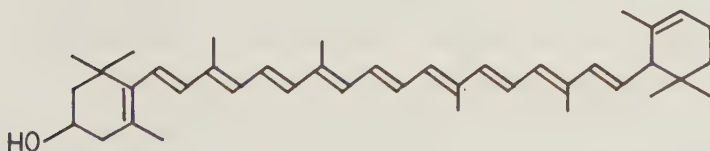
Tabelle 10:

	$\lambda_{\max}$ (in Hexan) [nm]			Autor
<u>Antheraxanthin</u>	420	444	472	A.Hager et al. ⁽⁸³⁾
	423	444	473	B.H.Davis ⁽³⁰⁾
	421	445	474	eigene Messung
<u>Peak 3</u> (Abb.26)				
<u>α-Kryptoxanthin</u>	422	445	475	D.J.Chapman ⁽⁹³⁾
	420	447	475	L.Cholnoky et al. ⁽¹⁰⁸⁾
	424	448	478	A.Hager et al. ⁽⁸³⁾
	424,5	449	475	eigene Messung
<u>Peak 7</u> (Abb.26)				

Antheraxanthin:



α -Kryptoxanthin:



Diese Zuordnung wird unterstützt vom Retentionsverhalten dieser beiden Carotinoide. Antheraxanthin wird bei der

Adsorptions-Chromatographie stärker als Lutein und schwächer als Violaxanthin retardiert, das α -Kryptoxanthin stärker als β -Carotin und schwächer als Lutein. Diese Elutionsordnung ist an der "reversed-phase"-Säule exakt umgekehrt.

Für das Chromatogramm der Abb. 26 kann insgesamt folgende Zuordnung getroffen werden:

Peak 1: Neoxanthin

Peak 2: Violaxanthin

Peak 3: Antheraxanthin

Peak 4: Lutein

Peak 5: Luteinepoxid-Isomeres (Taraxanthin, Isolutein)

Peak 6: Lutein-5,6-epoxid

Peak 7: α -Kryptoxanthin

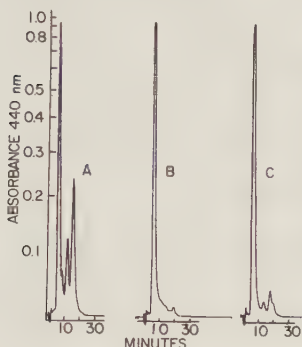
Peak 8: β -Carotin

5.8.3.2 Untersuchung der Zersetzlichkeit von Carotinoiden bei der Analyse

Die Leichtigkeit, mit der Isomerisierungen von Carotinoiden während des chromatographischen Trennvorganges stattfinden, hat bislang immer ein großes Problem für diese Analysen dargestellt. Wie bereits erwähnt, ist die Tendenz zur Isomerisierung stark abhängig von der Art des Sorptionsmittels (s. S. 18). I. Stewart et al.²¹⁾ untersuchten die Zersetzlichkeit von Lutein an Zinkcarbonat und stellten fest, daß nach einer Verweilzeit von zwei Stunden in der Säule ein

großer Teil des Ausgangsmaterials isomerisiert worden ist (Abb. 27 A). Eine Probe des Luteins, die zwei Stunden lang offen am Labortisch stand, zeigte kaum Isomerisierungsprodukte (Abb. 27 B).

Abbildung 27:



Chromatogram of lutein using zinc carbonate column and 5% TPA in hexane. (A) *trans*-Lutein was put on the column and left for 2 h prior to developing the chromatogram. Note isomer formation. (B) *trans*-Lutein which remained on the laboratory bench while A was being run. (C) *trans*-Lutein which remained on the laboratory bench for about 4 h and was then adsorbed on the column, pretreated with BHT, for an additional 2 h. It was then run through the column with the above mentioned solvent containing 1 g BHT in 100 ml.

Die enorme Zersetzlichkeit der Carotinoide in der Säule konnte von den Autoren vermindert werden durch Zugabe des Antioxidans' 2,6-di-tert.-Butylkresol (1g in 100 ml) zum Eluens (5 % tert.-Pentylalkohol in Hexan). Der Einfluß des Trennmaterials auf die Zersetzlichkeit der Proben ist umso gravierender, als die Analysendauer eines Pflanzen-Extraktes mit dem beschriebenen Trennsystem ca. fünf Stunden beträgt. Dabei kann man diese Methode im Vergleich zu DC-Trennungen sicherlich noch als schonend bezeichnen.

Zur Untersuchung der Stabilität von Carotinoiden an

"reversed-phase"-Sorbenzien wurde eine Probe reinen Luteins auf eine mit NUCLEOSIL 10 C₁₈ gepackte Säule aufgegeben (Eluens: Aceton/Wasser=100/20 v/v), der Durchfluß für eine Stunde unterbrochen und dann das Chromatogramm erstellt. Es konnten keinerlei Isomerisierungsprodukte festgestellt werden. Daneben wurde noch ein Versuch mit dem Ahorn-Extrakt gemacht, dessen Analyse in Abb. 26 gezeigt ist. Dabei blieben die Gesamt-Pigmente bei gestoppter Elution zwei Stunden lang in der Säule. Nach dem anschließenden Durchlauf war keinerlei Änderung gegenüber dem Chromatogramm der Abb. 26 zu erkennen.

Offensichtlich verhindert somit die Hydrophobierung der Oberfläche des Kieselgels bei "reversed-phase"-Sorbenzien Isomerisierungs-Tendenzen von Carotinoiden. Es wird also durch das Trennmateriail und zusätzlich noch durch die kurzen Analysenzeiten hier eine schonende Behandlung der Pigmente gewährleistet.

5.8.4 Carotinoide von Capsicum annuum

Die Frucht von rotem Paprika (*Capsicum annuum*) enthält eine Reihe verschiedener Carotinoide, die in Untersuchungen von L. Cholnoky et al.⁽¹⁰⁹⁾ zum großen Teil identifiziert worden sind. Nach ihren Angaben enthält die reife Frucht ca. 23 µg der Pigmente pro Gramm Frischmaterial. Die einzelnen Komponenten setzen sich zusammen aus Capso-
rubin, Capsanthin, Violaxanthin, Antheraxanthin, Lutein-

epoxid, Zeaxanthin, Kryptocapsin, Kryptoxanthin, β -Carotin und verschiedenen, meist nicht näher definierten Isomeren dieser Substanzen. Die für *Capsicum annuum* typischen Pigmente Capsorubin und Capsanthin bilden die Hauptbestandteile des Gesamtgehaltes. Einer Arbeit von K. Egger⁽¹¹⁰⁾ über DC-Untersuchungen von unverseiften Paprika-Extrakten ist zu entnehmen, daß alle Xanthophylle in der Frucht als Ester der drei Fettsäuren Palmitin-, Myristin- und Laurinsäure vorliegen.

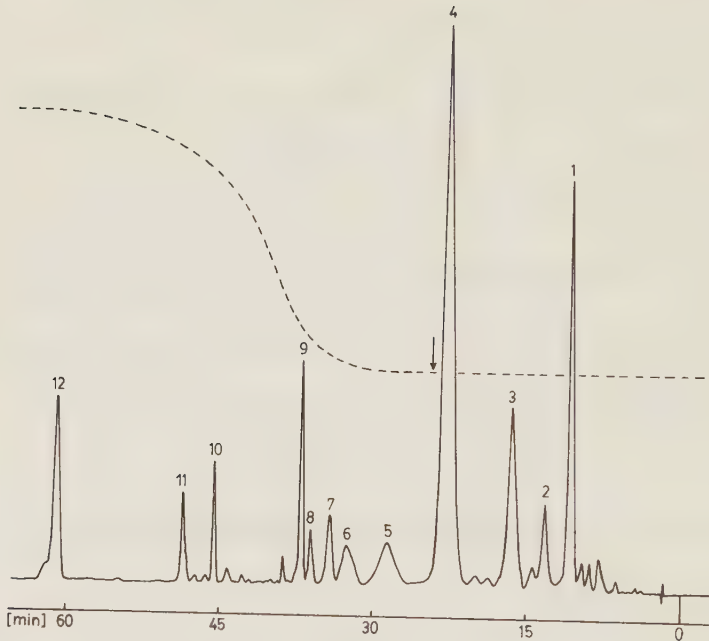
Neben der Trennung und Identifizierung der Pigmente eines verseiften Extraktes von frischen, roten Paprikaschoten mit der HPLC-Methode soll im folgenden die spektralphotometrische Detektion der Carotinoide bei verschiedenen Wellenlängen untersucht und die Erfassungsgrenze beschrieben werden.

5.3.4.1 Trennung und Identifizierung der Carotinoide

Die beste Trennung des sehr komplexen Pigment-Gemisches konnte wiederum am Sorbens NUCLEOSIL 10 C₁₈ erreicht werden. Die Abbildung 28 zeigt die Gradient-Analyse an einer Säule von 30 cm Länge und 4 mm Innendurchmesser. Die gesamte Trennung ist innerhalb von ca. 60 Minuten abgeschlossen und es können insgesamt etwa 30 Peaks von Substanzen unterschiedlichster Konzentrationen registriert werden.

Grundlage der Identifizierung der Hauptpeaks waren neben der Berücksichtigung des Retentionsverhaltens Absorptionsspektren der Substanzen, die nach einer mikropräparativen

Abbildung 28:



Trennung der Carotinoide von "*Capsicum annuum*".

Säule: L = 30 cm, I.D. = 4 mm; Sorbens: NUCLEOSIL 10 C₁₈, 10 µm; mobile Phase: Gradient von Aceton/Wasser = 100/50 nach 100/12 v/v, Mischkammervolumen: 15 ml; Druck: 150 bar; Durchfluß: 1,5 ml/min, Detektor: UV 450 nm.

Trennung an einer NUCLEOSIL 10 C₁₈-Säule (L=50 cm; I.D.= 6 mm) isoliert werden konnten.

Die Co-Injektion zum Chromatogramm der Abb. 28 mit aus Spinat isoliertem Violaxanthin und Lutein und synthetischem β -Carotin ergibt, daß Peak 3 und Violaxanthin, Peak 9 und Lutein, Peak 12 und β -Carotin gleich stark retardiert werden. Die ermittelten UV-Spektren bestätigen die endgültige Zuordnung.

Tabelle 11:

	$\lambda_{\max}$ (in Hexan) [nm]			Autor
<u>Violaxanthin</u> (aus Spinat-Extrakt)	417,5	441	470	eigene Messung
<u>Peak 3</u> (Abb.28)	419	441	468	eigene Messung
	$\lambda_{\max}$ (in Äthanol)			Autor
<u>Lutein</u> (aus Spinat-Extrakt)	421	446	475	eigene Messung
<u>Peak 9</u> (Abb.28)	424	447	475	eigene Messung
<u>β-Carotin</u>	425	450	477	A.Hager et al. ⁽⁸³⁾
	425	450	478	T.Hiyama et al. ⁽¹¹¹⁾
		451	482	P.Karrer et al. ⁽⁶⁸⁾
<u>Peak 12</u> (Abb.28)	427	451	478	eigene Messung

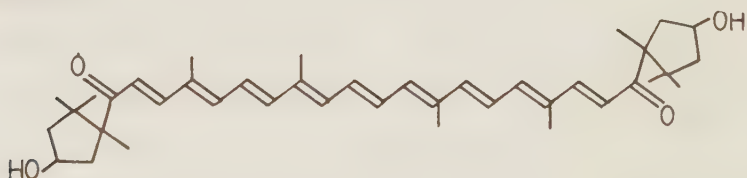
Aus dem Chromatogramm ist weiter zu entnehmen, daß die Substanzen der Peaks 1 und 4 in den weitaus größten Mengen-

anteilen vorliegen, was nach den Literaturangaben auf Capsorubin und Capsanthin hinweist. Im Sinne der Elutionsordnung an polaren Sorbenzien müßte Capsorubin hier im "reversed-phase"-System vor Capsanthin eluieren. Die UV-Daten der isolierten Substanzen beweisen die Identität von Peak 1 mit Capsorubin und Peak 4 mit Capsanthin.

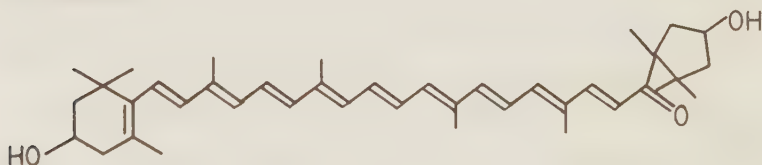
Tabelle 12:

	$\lambda_{\max}$ (in Benzol) [nm]			Autor
<u>Capsorubin</u>	455	486	520	B.H.Davis ⁽⁹⁵⁾
<u>Peak 1</u> (Abb.28)	458	484	519	eigene Messung
<u>Capsanthin</u>	453	484	515	M.S.Barber et al. ⁽¹¹²⁾
<u>Peak 4</u> (Abb.28)		483	509	eigene Messung

Capsorubin:



Capsanthin:



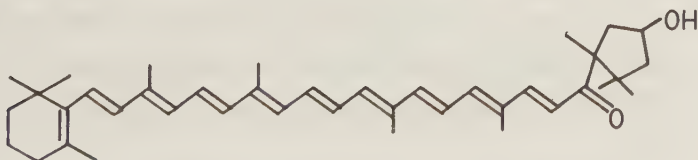
Während an Al_2O_3 die Adsorptions-Affinität von Violaxanthin und Neoxanthin größer ist, als die von Capsorubin und Capsanthin, wird an der "reversed-phase"-Säule das Violaxanthin zwischen Capsorubin und Capsanthin und Neoxanthin zusammen mit Capsorubin eluiert. Die exakte Umkehrung der Elutionsreihenfolgen ist hier wieder einmal durchbrochen.

Den Peaks 10 und 11 sind nach Retentionsverhalten und UV-Spektrum die Pigmente Kryptocapsin und α -Kryptoxanthin zuzuschreiben.

Tabelle 13:

	λ_{max} (in Benzol) [nm]			Autor
<u>Kryptocapsin</u>	486	520		F.H.Foppen ⁽⁶⁴⁾
<u>Peak 10</u> (Abb.28)	482	508		eigene Messung
<u>α-Kryptoxanthin</u>	435	459	489	A.Hager et al. ⁽⁸³⁾
	433	457	488	L.Cholnoky et al. ⁽¹⁰⁹⁾
<u>Peak 11</u> (Abb.28)	433,5	458	484	eigene Messung

Kryptocapsin:



Die Übereinstimmung der maximalen Absorptionen des Kryptocapsins mit den Literatur-Daten ist nicht günstig. Die untersuchte Substanz erfüllte jedoch genau die Beschreibung von

L. Cholnoky et al.⁽¹⁰⁹⁾, das Spektrum des Kryptocapsins sei dem des Capsanthins genau gleich. Sowohl in Benzol als auch in Äthanol waren Bandenform und Bandenlagen dieser beiden Carotinoide identisch, so daß an der Identität von Peak 10 mit Kryptocapsin wohl kein Zweifel besteht. Für die Peaks 2 und 5 - 8 konnte keine Zuordnung getroffen werden.

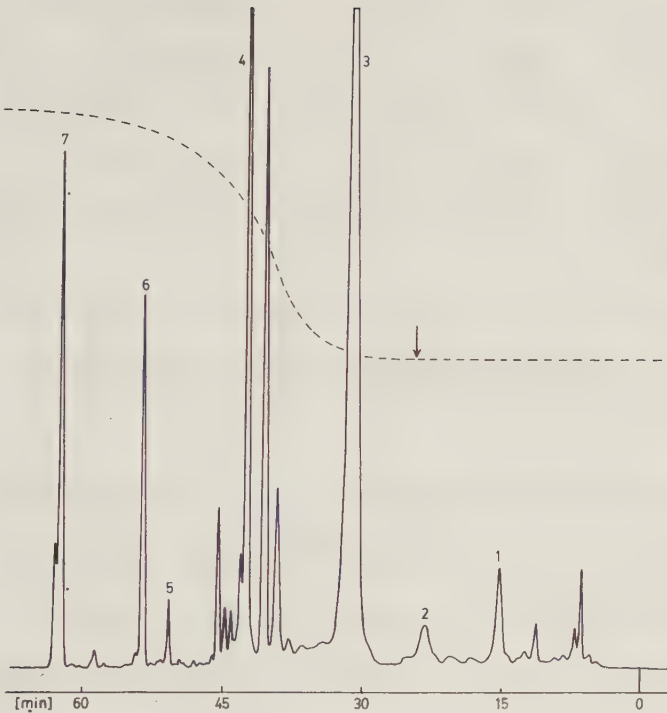
Zusammenfassung der identifizierten Substanzen aus dem Chromatogramm in Abb. 28:

- Peak 1 : Capsorubin
- Peak 3 : Violaxanthin
- Peak 4 : Capsanthin
- Peak 9 : Lutein
- Peak 10 : Kryptocapsin
- Peak 11 : α -Kryptoxanthin
- Peak 12 : β -Carotin

Der Analyse von Carotinoiden aus frischen Paprikaschoten sei noch ein Chromatogramm gegenübergestellt, das von einem Extrakt aus getrocknetem, käuflichem Paprikapulver ("Rosenpaprika") erhalten wurde (Abb. 29).

Neben einer unterschiedlichen mengenmäßigen Verteilung der einzelnen Pigmente stellte sich heraus, daß anstelle von Lutein im Paprikapulver Zeaxanthin vorlag (Peak 4).

Abbildung 29:



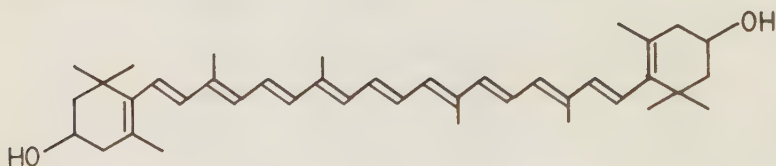
Trennung der Carotinoide von Paprikapulver.

Säule: L = 30 cm, I.D. = 4 mm; Sorbens: NUCLEOSIL 10 C₁₈, 10 µm; mobile Phase: Gradient von Aceton/Wasser = 100/50 nach 100/5 v/v, Mischkammervolumen: 15 ml; Druck: 150 bar; Durchfluß: 1,5 ml/min; Detektor: UV 450 nm.

Tabelle 14:

	λ_{max} (in Hexan) nm			Autor
<u>Zeaxanthin</u>	425	449	478	A.Hager et al. ⁽⁸³⁾
	426	450	478	B.H.Davis ⁽⁹⁵⁾
Peak 4 (Abb.29)	424	448	476	eigene Messung
<u>Zeaxanthin</u> (aus Safran)	424	449	477	eigene Messung

Zeaxanthin:



Mit der Analyse eines Gemisches von Lutein aus Spinat und Zeaxanthin aus Safran konnte gezeigt werden, daß sich diese beiden Xanthophylle am "reversed-phase"-Sorbens mit einem Aceton/Wasser-Gemisch als Eluens nicht trennen lassen.

Aus dem Vergleich mit dem Chromatogramm eines Paprika-schoten-Extraktes am gleichen Trennsystem lassen sich für die Banden der Abb. 29 folgende Carotinoide zuordnen:

- Peak 1 : Capsorubin
- Peak 2 : Violaxanthin
- Peak 3 : Capsanthin
- Peak 4 : Zeaxanthin
- Peak 5 : Kryptocapsin
- Peak 6 : α -Kryptoxanthin
- Peak 7 : β -Carotin

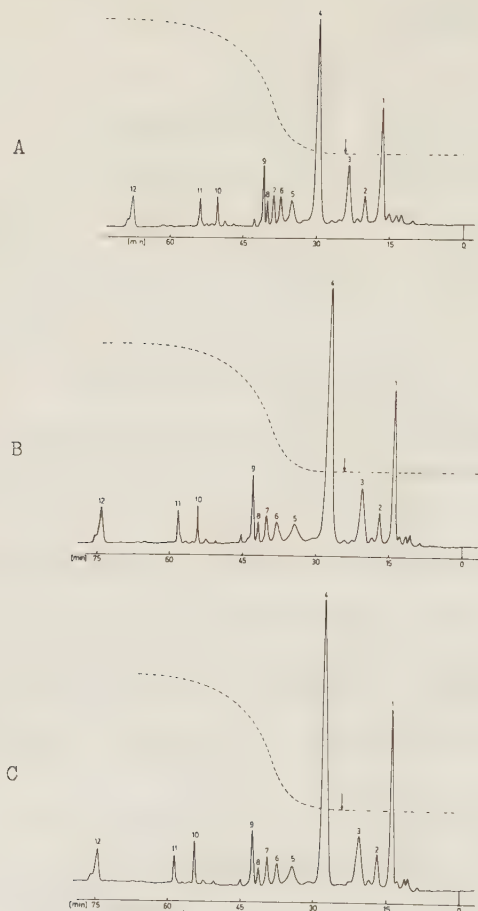
5.8.4.2 Detektion bei verschiedenen Wellenlängen und Erfassungsgrenze

Um den Einfluß der Meßwellenlänge auf die Detektion von Carotinoiden festzustellen, wurde ein Extrakt von Paprikaschoten dreimal nacheinander chromatographiert und die Signale bei 435, 450 und 465 nm "Detektions-Wellenlänge" einander in Abbildung 30 gegenübergestellt.

Wie zu erwarten, nimmt die Peak-Höhe von Capsorubin, Capsanthin und α -Kryptoxanthin (Peak 1, 4 und 10) in Bild B und C zu, da deren Absorptions-Maxima über 480 nm liegen. Die Detektion von Lutein (Peak 9) ist im Bild B bei 450 nm am günstigsten, während Violaxanthin (Peak 3) bei 435 und 450 nm gleich gut erfaßt wird. Alles in allem kann man aber feststellen, daß die "Meß-Wellenlänge" im Bereich zwischen 430 und 470 nm auf die Registrierung der Carotinoide nicht von gravierendem Einfluß ist, da deren Absorption im sichtbaren Spektralbereich in der Regel als breite Kurve vorliegt auf die einzelne kleine Gipfel (Maxima) aufgesetzt sind.

Bewegt man sich an der untersten Erfassungsgrenze von Pigmenten, so ist es zweifellos notwendig, bei der "optimalen Wellenlänge" zu detektieren. Die Erfassungsgrenze ist definiert als die kleinste Probenkonzentration, welche Signale von der doppelten Höhe des Rauschens erzeugt. Für β -Carotin betrug diese Nachweisgrenze ca. $3 \cdot 10^{-9} \text{ g} = 5 \cdot 10^{-12} \text{ Mol}$ bei 450 nm Detektions-Wellenlänge.

Abbildung 30:



Trennung der Carotinoide von "Capsicum annuum". Detektion bei verschiedenen Meßwellenlängen.

Säule: L = 30 cm, I.D. = 4 mm; Sorbens: NUCLEOSIL 10 C₁₈, 10 µm; mobile Phase: Gradient von Aceton/Wasser = 100/50 nach 100/12 v/v, Mischkammervolumen: 15 ml; Druck: 125 bar; Durchfluß: 1,1 ml/min; Detektor: UV 435 (A), 450 (B) und 465 (C) nm.

Diese Erfassungsgrenze der verwendeten Apparatur liegt damit etwa um den Faktor 20 tiefer als die unterste Nachweisgrenze, die in der Dünnschicht-Chromatographie qualitativ mit Jod als Anfärbereagens erreicht werden kann. Es ergeben sich damit neue Maßstäbe bei der Aufklärung von Pigment-Spuren vor allem in biologischen Materialien.

5.8.5 Carotinoide in Ei-Pulver

Es ist seit langem bekannt, daß sauerstoffhaltige Carotinoide, die mit dem Futter aufgenommen werden, für die Färbung von Eigelb, Schnabel und Beinen zahlreicher Vögel verantwortlich sind⁽¹¹⁴⁾. Für die Ablagerung im Eidotter ist eine Voraussetzung an die durch Nahrung zugeführten Pigmente gestellt: die Carotinoide müssen sauerstoffhaltige funktionelle Gruppen wie Hydroxyl-, Keto- oder Estergruppierungen besitzen. Weder im Futter enthaltene Carotin-Kohlenwasserstoffe noch stark polare Carotinoide, die etwa Carboxylgruppen enthalten, gehen in nennenswertem Maß in die Dotter über. E.M. Bickoff⁽¹¹⁵⁾ beschreibt neben Spuren von β -Carotin das Vorkommen von Kryptoxanthin, Lutein und Zeaxanthin.

In modernen Intensivhaltungen werden die Tiere mit konzentriertem, meist Carotinoid-armem Futter ernährt, was zu schwach pigmentierten Eidottern und blasser Hautfarbe des Geflügels führt. Um dem entgegenzuwirken, d.h. um dem "Geschmack" des Verbrauchers entgegenzukommen, wird die

Farbe von Eidotter und Haut des Geflügels vertieft durch Zugabe synthetischer Pigmente wie β -Apo-8'-carotinal und Canthaxanthin zum Futter.

In Deutschland werden Futtermittelzusätze zur Eidotterfärbung lebensmittelrechtlich nicht beanstandet, "sofern keine vom Verbraucher als unnatürlich empfundenen, überstarken oder blutroten Färbungen festzustellen sind"⁽¹¹⁶⁾.

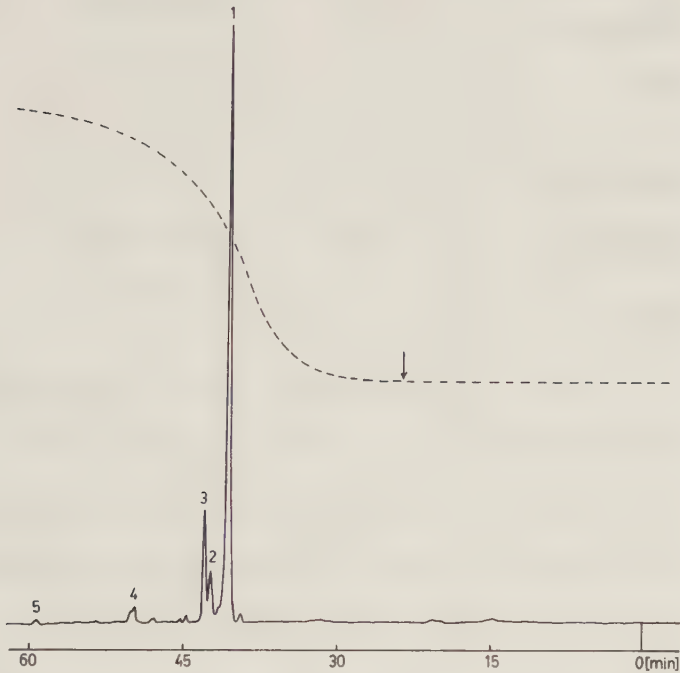
Neben der HPLC-Analyse der "natürlichen Carotinoide" wird im folgenden eine Methode beschrieben, die künstliche Pigmentierung von Eidottern mit β -Apo-8'-carotinal und Canthaxanthin schnell und sicher zu erkennen.

5.3.5.1 Trennung und Identifizierung der Pigmente

Ein aus Ei-Pulver nach der auf Seite 38 beschriebenen Methode gewonnener Carotinoid-Extrakt wurde an dem in Abb. 26 beschriebenen Trennsystem unter denselben äußeren Bedingungen getrennt. Das Chromatogramm zeigt die Abbildung 31. Aus dem Vergleich der beiden Analysen ist zu ersehen, daß nach dem Retentionsverhalten folgende Zuordnung für die Substanz-Peaks aus Abb. 31 getroffen werden kann: Peak 1 = Lutein; Peak 2 = Taraxanthin bzw. Isolutein; Peak 3 = Luteinepoxid; Peak 4 = Kryptoxanthin, Peak 5 = β -Carotin.

Die UV-Spektren von Peak 1 und 3 bestätigen diese Zuordnung:

Abbildung 31:



Trennung der Carotinoide von Eipulver.

Säule: L = 50 cm, I.D. = 6 mm; Sorbens: NUCLEOSIL 10 C₁₈,
10 µm; mobile Phase: Gradient von Aceton/Wasser =
100/40 nach 100/5 v/v, Mischkammervolumen: 15 ml; Druck:
85 bar; Durchfluß: 1,6 ml/min; Detektor: UV 450 nm.

Tabelle 15:

	$\lambda_{\max}$ (in Hexan) [nm]			Autor
<u>Lutein</u> (aus Spinat)	421	446	475	eigene Messung
<u>Peak 1</u> (Abb.31)	422	445	472	eigene Messung
<u>Luteinioxid</u> (synthetisch)	417	440	468	eigene Messung
<u>Luteinioxid</u> (aus Spinat)	417	439	468	eigene Messung
<u>Peak 3</u> (Abb.31)	417	441	467	eigene Messung

Die Co-Injektion von synthetischem Material weist auf die Identität von Peak 5 mit β -Carotin hin. Von den Peaks 2 und 4 lag nicht genügend an isolierter Substanz vor, um nähere Untersuchungen vornehmen zu können. Man kann bei Peak 4 deutlich zwei Gipfel erkennen, die wahrscheinlich von den α - und β -Isomeren des Kryptoxanthins gebildet werden.

Eine Möglichkeit der Optimierung der Analyse in Bezug auf Peak-Kapazität, Analysendauer und Auflösung zeigt die Abb. 32. Dabei ist zwischen Peak 2 und 3 Grundlinien-Trennung erreicht und die Gesamtdauer der Analyse auf 45 Minuten reduziert worden.

Die Carotinoide, die aus dem vorliegenden Ei-Extrakt isoliert werden konnten, sind "natürlicher" Art, d.h. sie sind in Form von pflanzlicher Nahrung dem Huhn zugeführt

Abbildung 32:



Trennung der Carotinoide von Eipulver.

Säule: L = 50 cm, I.D. = .6 mm; Sorbens: NUCLEOSIL 10 C₁₈, 10 µm; mobile Phase: Gradient von Aceton/Wasser = 100/25 nach 100/5 v/v; Mischkammervolumen: 15 ml; Druck: 82 bar; Durchfluß: 2 ml/min; Detektor: UV 450 nm.

worden. Es gilt nun, die Tauglichkeit des beschriebenen Trennsystems (Abb. 32) auch für die Substanzen zu untersuchen, die zur künstlichen Pigmentierung des Dotters verwendet werden.

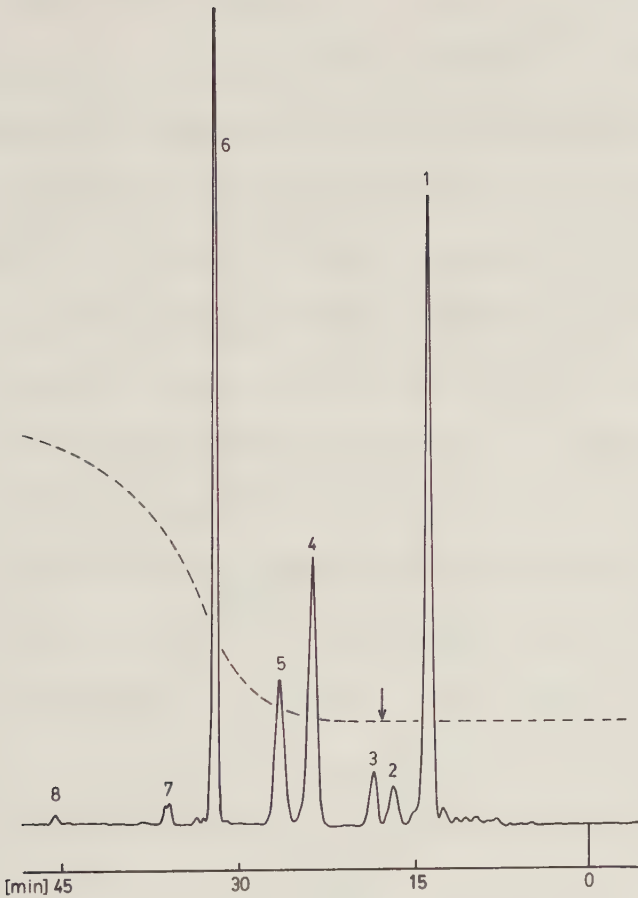
5.8.5.2 Nachweis von synthetischen Zusätzen

Zahlreiche Versuche haben ergeben, daß durch Zusatz von β -Apo-8'-carotinal bzw. β -Apo-8'-carotinsäureäthylester zum Intensiv-Futter eines Huhnes jede "natürliche" Eidotterfärbung zu erzielen ist⁽¹¹⁷⁾. Zusatz von Canthaxanthin bewirkt eine deutliche Pigmentierung von Haut und Läufen des Geflügels und verstärkt den rot-orangen Farbton des Dotters.

Aus diesen inzwischen in der Tierhaltung praktizierten Möglichkeiten ergibt sich für den Analytiker die Aufgabe, die mit synthetischen Pigmenten angefärbten Eiprodukte zu unterscheiden von Eigelb, dessen Carotinoide ausschließlich mit pflanzlichem Futter zugeführt worden sind.

Da Canthaxanthin ohne chemische Veränderung im Eidotter abgelagert wird und β -Apo-8'-carotinal, das sich zum größten Teil in β -Apo-8'-carotinsäure umwandelt⁽¹¹⁸⁾, auch in der ursprünglichen Form noch im Dotter nachzuweisen ist, wurden dem "natürlichen".Ei-Extrakt diese beiden Präparate (Hoffmann-La Roche) beigemischt. Die Abbildung 33 zeigt das Ergebnis dieser Analyse, für die das gleiche Trennsystem wie in Abb. 32 verwendet wurde.

Abbildung 33:



Trennung der Carotinoide von Eipulver und von synthetischen Pigmentzusätzen.

Trennsystem und Analysenbedingungen wie in Abb.32.

Die synthetischen Pigmentierungsmittel werden als drei neue diskrete Peaks registriert, wobei die Peaks 4 und 5 all-trans und cis Isomere des Canthaxanthins und Peak 6 daß β -Apo-8'-carotinal beinhalten.

Es ist damit aus dem Chromatogramm (hier unter simulierten Bedingungen) auf einen Blick zu erkennen, ob synthetische Carotinoide im Eidotter enthalten sind, zumal ihre Konzentration die der natürlichen in der Regel weit übersteigt, um den gewünschten Effekt zu erzielen. Wie in Kapitel 5.8.1.3 gezeigt, können zugleich auch quantitative Aussagen getroffen werden.

Die von M. Osadca et al.⁽¹¹⁹⁾ ausgearbeiteten Methoden zum Nachweis der Color-Additive β -Apo-8'-carotinal und Canthaxanthin in Tomatensoßen, Orangensäften, Kuchen und Käse stützen sich auf klassische Säulen-Chromatographie mit verschiedenen Sorbenzien, begleitende DC-Reinheitskontrollen von isolierten Substanzen und deren spektral-photometrische quantitative Bestimmung. Dabei ist für jedes der beiden Pigmente zur Isolierung ein spezielles Trennverfahren anzuwenden.

Untersuchungen solcher Art können mit der hier beschriebenen HPLC-Analyse innerhalb von weniger als 60 Minuten sowohl qualitativ als auch quantitativ zuverlässig in einem einzigen Arbeitsgang durchgeführt werden.

6 Kritische Betrachtung der "reversed-phase"-
 HPLC Analyse

In den Kapiteln 5.8.1 bis 5.8.5 sind an ausgewählten Beispielen, die dazu jeweils besonders geeignet schienen, die Charakteristika der "reversed-phase"-Chromatographie von Carotinoiden und Möglichkeiten für die Auswertung der erhaltenen Ergebnisse beschrieben worden. Selbstverständlich sind alle diskutierten Parameter für die "optimale" Durchführung jeder einzelnen Analyse relevant. Die wichtigsten Erkenntnisse, die dabei gewonnen wurden, sollen nun noch einmal zusammengefaßt in einer kritischen Betrachtung den bislang geübten klassischen Verfahren gegenübergestellt und auf mögliche Weiterentwicklungen hin untersucht werden.

Von den verwendeten "reversed-phase"-Sorbenzien erfüllte vor allem das NUCLEOSIL 10 C₁₈ all jene Bedingungen, die grundsätzlich an stationäre Phasen gestellt werden: es ist gut reproduzierbar in Säulen der üblichen Dimensionen zu packen, bietet ausgezeichnete und leicht erzielbare Trennleistungen ($N > 27.000$ pro Meter Säule) und kann in ein und derselben Säule für mehr als 100 Analysen verwendet werden. Sofern dann ein Absinken der Trennleistung zu verzeichnen ist, kann man es nach Entleeren der Säule und Eluieren mit apolaren Lösungsmitteln wie z.B. Äther regenerieren und für neue Säulenfüllungen wieder einsetzen. Es löst keine Isomerisierung von Carotinoiden aus und zeigt dieser Substanz-

klasse gegenüber hervorragende Selektivitätseigenschaften.

Die Lösungsmittelgemische, die eingesetzt wurden (Aceton/Wasser), erfordern keine speziellen Vorreinigungsschritte; sie sind billig und haben bei den Mischungsverhältnissen von Aceton/Wasser = 100/40 bis 100/5 eine geringe Viskosität, wodurch schon mit relativ niedrigem Säulendruck gute Durchflußraten ermöglicht werden. Mit Solvenzien wie Acetonitril und Tetrahydrofuran im geeigneten Gemisch mit Wasser waren etwa gleiche Trennleistungen zu erzielen, ihre Verwendung ist aber erheblich kostspieliger.

Eine Erhöhung der Selektivität durch Variation der Eluens-Zusammensetzung ist aus Kenntnis der behandelten komplexen Carotinoid-Gemische nur für vereinzelte Probleme notwendig. Das Isomerenpaar Lutein-Zeaxanthin sowie Isomerisierungsprodukte von Carotinen erfordern noch eine Optimierung des Trennsystems. Neueste Ergebnisse aus der sog. "Komplexierungs-Gas-Chromatographie" mit Rhodium- oder Kobalt-Komplexen⁽¹²⁰⁾, die in der stationären Phase lokalisiert sind, könnten, auf die "reversed-phase"-HPLC übertragen, hier eventuell eine weitere Verbesserung in der Selektivität mit sich bringen. Sie sollen im Gegensatz zu den untersuchten Silber-Komplexen keine Isomerisierung und Zersetzung begünstigen.

War es bei den klassischen chromatographischen Methoden bislang notwendig, die Sorbenzien und Lösungsmittelgemische immer speziell auf das jeweilige Trennproblem hin abzustimmen und nacheinander Carotine und Xanthophylle zu analysieren, so bietet das beschriebene "reversed-phase"-

Trennsystem bei Anwendung eines kontinuierlichen Gradienten nun die Möglichkeit, Carotinoide unterschiedlichster Polarität in einem Analysengang zu erfassen. Die Trennung eines unverseiften Pigment-Extraktes von käuflichem Safran-Pulver (Abb. 34) zeigt, daß an einer NUCLEOSIL 10 C₁₈-Säule (I.D.: 6 mm; L: 50 cm) mit einem geeigneten Gradienten (Aceton/Wasser = 100/50 nach 100/2,5) neben den Xanthophyllen mit den Hauptkomponenten Crocetin (Peak 1) und Zeaxanthin (Peak 2) und dem β-Carotin (Peak 3) auch noch die Fettsäureester von Xanthophyllen (Peakgruppe 4) in einem einzigen Durchlauf erfaßt werden können.

Tabelle 16:

	$\lambda_{\max}$ (in Hexan) [nm]			Autor
<u>Crocetin</u>	400	420	445	P.Karrer et al. ⁽⁶³⁾
<u>Peak 1</u> (Abb.34)	399	420	447	eigene Messung
<u>Zeaxanthin</u>	425	449	478	A.Hager et al. ⁽⁸³⁾
	423	451	483	T.W.Goodwin ⁽¹⁹⁾
<u>Peak 2</u> (Abb.34)	424	449	477	eigene Messung

Aus dem Chromatogramm der Abbildung 34 ist zu ersehen, daß hier in einem Analysengang mehr als 60 Carotinoide zum Teil in kleinsten Konzentrationen registriert werden konnten. Für diese Trennleistung waren bei der verwendeten Säule Bodenhöhen von weniger als 20 µm erforderlich; das entspricht einem mit dem Faktor zwei multiplizierten Teilchen-

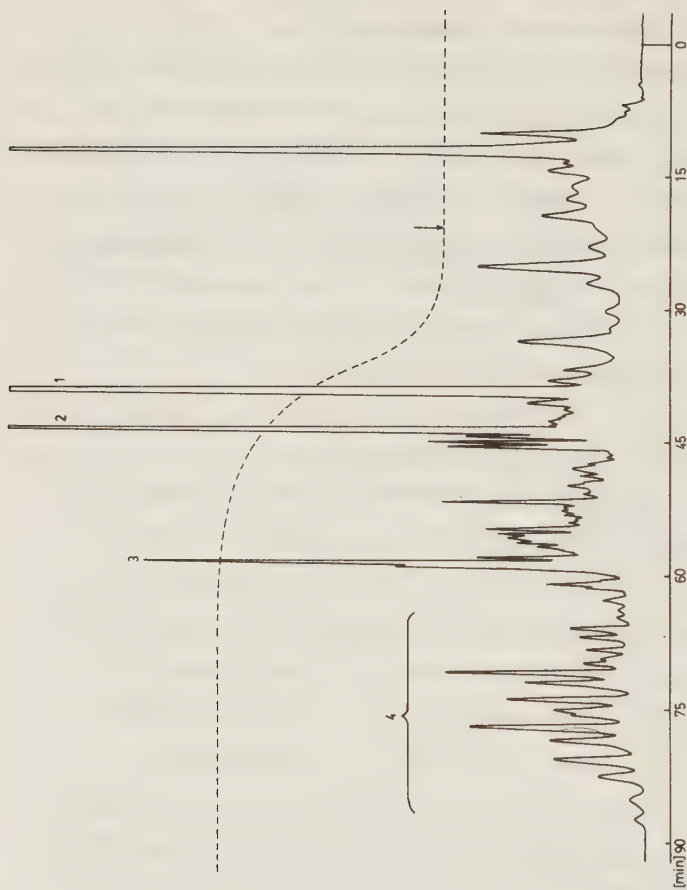


Abbildung 34: Trennung der Carotinoide von Safranpulver.

Säule: L = 50 cm, I.D. = 6 mm; Sorbens: NUCLEOSIL 10 C₁₈, 10 µm; mobile Phase: Gradient von Aceton/Wasser = 100/50 nach 100/2,5 v/v, Mischkammervolumen: 15 ml; Druck: 87 bar; Durchfluß: 1,6 ml/min; Detektor: UV 450 nm.

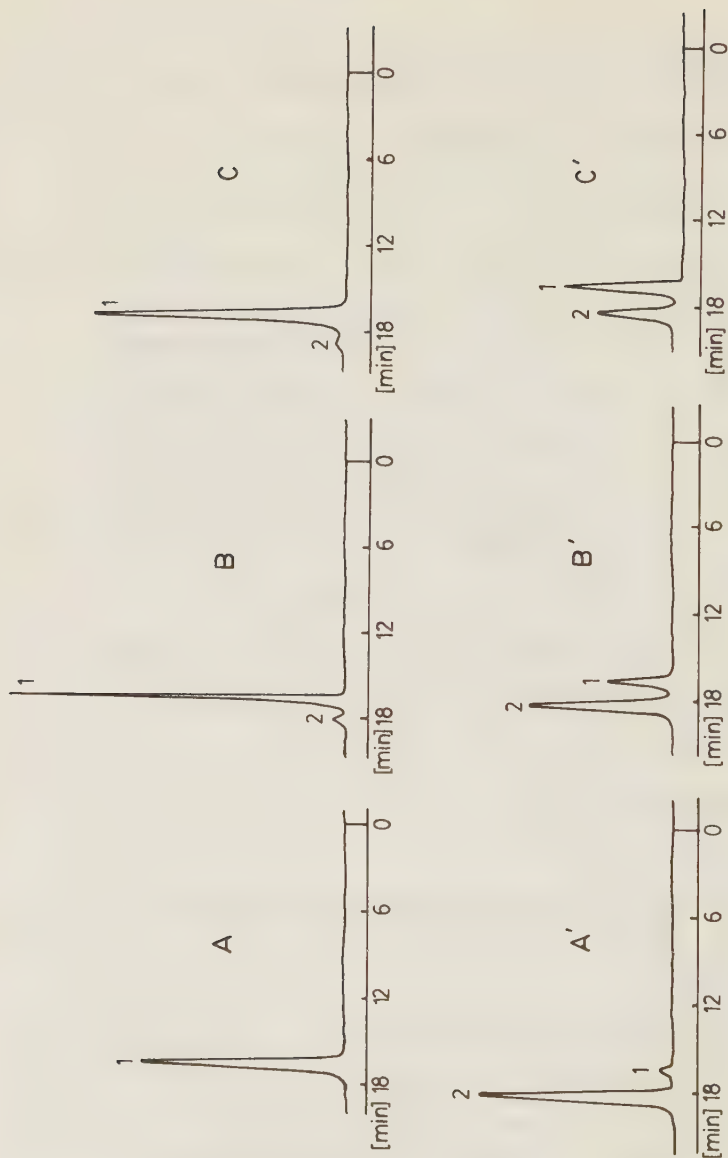
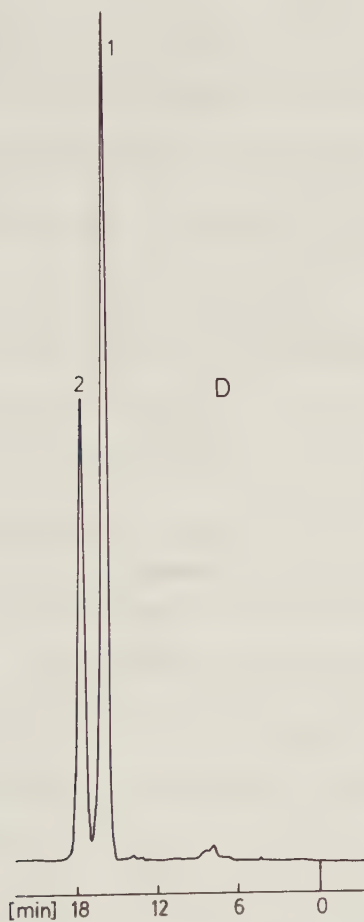


Abbildung 35: Trennung von Isomerenmischungen des Canthaxanthins.

Säule: $L = 50$ cm, I.D. = 6 mm; Sorbens: NUCLEOSIL 10 C₁₈; 10 µm; mobile Phase: Aceton/Wasser = 100/20 v/v; Druck: 73 bar; Durchfluß: 2 ml/min; Detektor: UV 450 nm.

Abbildung 35 (Fortsetzung):



Trennsystem und Analysenbedingungen siehe Seite 124.

produkt. Dagegen erfährt das unmittelbar nach der Elution isolierte cis-Produkt sofort eine teilweise Umwandlung in die trans-Form (Chrom. A'). In noch deutlicherem Maße erfolgt dies bei der Aufnahme des Absorptions-Spektrums (Chrom. B') und bei zweistündigem Stehen am Labortisch (Chrom. C'), bis sich schließlich das im Gleichgewicht befindliche Isomerengemisch (Chrom. D) eingestellt hat.

Dieses Beispiel zeigt, von welch gravierendem Einfluß die Handhabung der Proben sein kann. Die quantitative Erfassung dieser Isomerisierung im klassischen Stil mit Trennung, Isolierung der Substanz und photometrischer Vermessung ist absolut ungeeignet, da bei jedem dieser einzelnen Arbeitsschritte durch weitere Isomerisierungen das Ergebnis verfälscht wird.

Dagegen ist es leicht möglich, nach Aufstellung einer Eichkurve direkt aus dem Chromatogramm der HPLC-Analyse quantitative Aussagen über die Zusammensetzung des Isomerengemisches mit einer Fehlerbreite von 1 - 2 % zu treffen.

Bei der Durchführung präparativer Trennungen bietet die "reversed-phase"-HPLC von Carotinoiden den großen Vorteil, daß infolge des erzielbaren Auflösungsvermögens sehr reine Substanz-Fractionen isoliert werden können. Waren die Substanzmengen, die nach den Trennungen mit den hier eingesetzten Kolonnen aufgefangen werden konnten, noch gering, so ist es sicherlich möglich, bei Verwendung von Säulen mit größeren Innendurchmessern auch Mengen zu isolieren, wie man sie üblicherweise mit klassischen Säulen

erhalten kann.

Die Nachweisgrenze von ca. 10^{-12} Mol an Carotinoiden pro Dosiervolumen, die hier erreicht wurde, macht es möglich, in Zukunft auch Pigment-Spuren zu erfassen, die mit klassischen Methoden (DC) nicht mehr nachzuweisen sind. Gerade in biologischen Materialien sind Carotinoide oft in verschwindend geringer Konzentration enthalten, so daß insbesondere an die Proben-Detektion große Ansprüche gestellt werden.

Aussagen über die Natur solch geringer Pigment-Spuren können nur noch aus dem jeweiligen Retentionsverhalten durch Zuordnung von Analysen mit bekannten Substanzen getroffen werden. Dabei ist die Wiederholbarkeit der Trennungen von großer Bedeutung. Mit der beschriebenen Apparatur ist man in der Lage, bei isokratischen Trennungen mit 1 %, bei Gradient-Analysen mit 2 - 3 % Genauigkeit aus Kenntnis der k' bzw. k -Werte unbekannte Stoffe den Werten einer bekannten Analyse zuzuordnen. Durch größeren apparativen Aufwand, wie etwa den Einsatz einer "flow feedback-Kontrolle" zur Überwachung der Konstanz der Fließmittelgeschwindigkeit, wäre es möglich, hier noch kleinere Fehlerbreiten zu erreichen.

Abschließend kann festgestellt werden, daß sich die selbst zusammengestellte HPLC-Apparatur sowohl für qualitative als auch für quantitative Trennungen von Carotinoiden hervorragend bewährt hat. Mit den beschriebenen "reversed-phase"-Trennsystemen ist man in der Lage, schnell, schonend und empfindliche Pigmenttrennungen mit ausgezeichnetem Auflösungsvermögen zu erhalten.

Zusammenfassung

Zur Reindarstellung von Carotinoiden aus synthetischen wie auch aus biologischen, oft sehr komplexen Substanzgemischen wurden bislang viele chromatographische Trenntechniken, von der klassischen Säulen-, Papier- und Dünnschicht-Chromatographie bis hin zur Gas-Chromatographie angewendet. Mit keiner dieser Methoden ist man jedoch in der Lage, Carotinoid-Gemische hinreichend schnell, schonend und empfindlich in nur einem Arbeitsgang präparativ oder rein analytisch zu trennen. Die vorliegende Arbeit zeigt, daß dieses Ziel mit Hilfe der modernen Hochdruck-Flüssigkeits-Chromatographie erreicht werden kann.

Zur Durchführung der Untersuchungen wurde ein Gerät aus geeigneten Bauteilen selbst zusammengestellt. Es trug apparativ den speziellen Erfordernissen, die diese Substanzklasse an die Chromatographie stellt, in besonderem Maße Rechnung. Die Trennung erfolgte an "reversed-phase"-Systemen. Als stationäre Phasen dienten Sorbenzien, deren Oberfläche durch chemisch gebundene Alkylketten hydrophobiert war. Die mobile Phase bestand aus Aceton/Wasser-Gemischen. Von den eingesetzten "reversed-phase"-Sorbenzien CORASIL C₁₈ (Fa. Waters), Perisorb RP (Fa. Merck) und Merckosorb RP 8 (Fa. Merck) zeigte besonders NUCLEOSIL 10 C₁₈ (Fa. Macherey-Nagel & Co) hervorragende Trenn-

eigenschaften. Zum Nachweis der getrennten Komponenten wurde ein Doppelstrahl-Spektralphotometer-Detektor verwendet.

An NUCLEOSIL 10 C₁₈ können mit dieser Apparatur die Pigmente eines Extraktes der Frucht von "Solanum lycopersicum" isokratisch innerhalb von ca. zehn Minuten getrennt und dabei theoretische Bodenzahlen von $N > 27.000$ pro Meter Trennsäule erreicht werden. Es wird gezeigt, daß direkt aus dem Chromatogramm auch quantitative Aussagen über die mengenmäßige Verteilung der einzelnen Komponenten mit einer Fehlerbreite von ca. 1 - 2 % gemacht werden können.

Die Identifizierung der Carotinoide erfolgte nach einer mikropräparativen Trennung und Isolierung der Reinsubstanzen in erster Linie durch Aufnahme von UV-Spektren und Zuordnung der charakteristischen Absorptionen nach Literaturwerten. Außerdem ließ das Retentionsverhalten ausgezeichnete Rückschlüsse auf die Natur der zugrundeliegenden Substanzen zu.

Die Anwendung von Elutions-Gradienten ermöglicht die Trennung von Pigmenten mit sehr unterschiedlicher Polarität in einem Durchlauf. Carotine und Xanthophylle von "Spinacia oleracea" ließen sich so zusammen innerhalb von 60 Minuten trennen. Untersuchungen über die Wiederholbarkeit der Analysen ergaben, daß bei isokratischer Arbeitsweise Abweichungen in den Retentionsdaten von 1 %

und bei Gradient-Analysen von lediglich 2 - 3 % zu registrieren sind. Diese Ergebnisse garantieren auf der einen Seite die Möglichkeit, Komponenten unbekannter Gemische anhand von Retentionsdaten im Chromatogramm zu charakterisieren bzw. zu identifizieren; auf der anderen Seite bieten sie die Voraussetzung für eine problemlose Übernahme dieser Analysentechnik in den Routinebetrieb.

Ein großer Vorteil der verwendeten "reversed-phase"-Trennsysteme liegt zudem darin, daß bei den überaus empfindlichen, zu Isomerisierung und Zersetzung neigenden Pigmenten während des Trennvorganges in der Säule keinerlei Veränderungen festgestellt wurden.

An weiteren Trennbeispielen der Carotinoide von "Acer platanoides", "Capsicum annuum" und Safran-Pulver wurde die Leistungsfähigkeit dieser neuen Methode demonstriert. Ihre praktische Verwendbarkeit auf den Gebieten der Produktkontrolle und in der Lebensmittelchemie zeigt die Analyse der Pigmente von Eipulver. Synthetische Color-Additive können neben den natürlichen Farbstoffen schnell und sicher nachgewiesen werden.

Es hat sich insgesamt erwiesen, daß die "reversed-phase"-Hochdruck-Flüssigkeits-Chromatographie in der Lage ist, komplexe Carotinoid-Gemische schnell, schonend und exakt wiederholbar zu trennen und quantitativ zu bestimmen. Darüber hinaus können selbst Pigmentspuren bis zu einer Nachweisgrenze von ca. 10^{-12} Mol (10^{-9} g) erfaßt werden, was gegenüber den bisherigen Verfahren eine Verbesserung um den Faktor 20 bedeutet.

Literaturverzeichnis

- 1) G.Hesse, H.Weil, "Michael Tswett's First Paper on Chromatography", M.Woelm, Eschwege 1954.
- 2) R.Kuhn, A.Winterstein u. E.Lederer, Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem. 197, 141 (1931).
- 3) L.Zechmeister, "Carotinoide, ein biochemischer Bericht über pflanzliche und tierische Polylenfarbstoffe", Springer-Verlag, Berlin 1934.
- 4) P.Karrer, C.H.Eugster, Helv. Chim. Acta 33, 1172 (1950).
- 5) H.H.Inhoffen, Liebigs Ann. Chem. 569, 237 (1950).
- 6) M.Osadca, E.DE Ritter u. R.H.Bunnell, J. Assoc. off. anal. Chemists 49, 1078 (1966).
- 7) European J. Biochem. 25, 397 (1972).
- 8) O.Isler in "Carotinoids", S. 325, Birkhäuser-Verlag Basel (1971).
- 9) O.Isler u. P.Schudel in "Advances in Organic Chemistry", Vol. 4, Interscience Publishers, New York (1963).
- 10) O.Isler, W.Huber, A.Ronco u. M.Kofler, Helv. Chim. Acta 30, 1911 (1947).
- 11) H.J.Bestmann, L.Kisielowski u. W.Distler, Angew. Chem. 88, 297 (1976).
- 12) J.B.Davis in "Rodd's Chemistry of Carbon Compounds", Vol. 2, 252, Elsevier Publ. Comp. (1968).
- 13) L.Zechmeister, Fortschr. Chem. org. Naturst. 18, 253 (1960).

- 14) loc. cit. 12) S.256.
- 15) loc. cit. 8) S.204.
- 16) loc. cit. 8) S.253.
- 17) B.L.C.Weedon, Fortschr. Chem. org. Naturst. 27,
98 (1969).
- 18) L.Zechmeister, "Cis-trans Isomeric Carotenoids,
Vitamin A and Polyenes", Springer-Verlag, Berlin (1962).
- 19) T.W.Goodwin in "Moderne Methoden der Pflanzenanalyse",
3.Bd., S.303, Springer-Verlag, Berlin (1955).
- 20) P.Karrer u. U.Solmssen, Helv. Chim. Acta 20, 682 (1937).
- 21) R.Kuhn u. H.Brockmann, Liebigs Ann. Chem. 516, 95 (1935).
- 22) N.L.Wendler, C.Rosenblum u. M.Tishler, J. Amer. Chem.
Soc. 72, 234 (1950).
- 23) P.Karrer u. E.Jucker, Helv. Chim. Acta 28, 300 (1945).
- 24) L.Zechmeister u. L.Wallcave, J. Amer. Chem. Soc. 75,
4493 (1953).
- 25) P.Karrer u. E.Leumann, Helv. Chim. Acta 34, 445 (1951).
- 26) L.Zechmeister u. F.J.Petracek, J. Amer. Chem. Soc. 78,
1427 (1956).
- 27) B.L.C.Weedon u. C.K.Warren, J. Chem. Soc., London,
1958, 3972.
- 28) P.Karrer u. E.Jucker, Helv. Chim. Acta 28, 303 (1945).
- 29) loc. cit. 19) S.283.
- 30) B.H.Davis in "Chemistry and Biochemistry of Plant
Pigments", S. 501, Ac. Press London (1965).
- 31) P.Karrer u. O.Walker, Helv. Chim. Acta 16, 641 (1933).
- 32) H.H.Strain, J. biol. Chem. 105, 523 (1934).

- 33) H.H.Strain, J. biol. Chem. 127, 191 (1939).
- 34) A.E.Gillam u. M.S.El Ridi, Biochem. J. 30, 1735 (1936).
- 35) A.E.Gillam, M.S.El Ridi u. S.K.Kon, Biochem. J. 31, 1605 (1937).
- 36) loc. cit. 19) S.286.
- 37) P.Karrer u. E.Jucker in "Carotinoide", S. 68, Birkhäuser-Verlag, Basel (1948).
- 38) loc. cit. 30) S.507.
- 39) H.R.Bolliger u. A.König in "Dünnschicht-Chromatographie" von E.Stahl (Verf.), S. 260, 2. Aufl., Springer-Verlag, Berlin (1967).
- 40) A.Hager u. T.Meyer-Bertenrath, Planta (Berl.) 69, 198 (1966).
- 41) H.R.Bolliger in "Dünnschicht-Chromatographie" von E.Stahl (Verf.), S. 224, Springer-Verlag, Berlin (1962).
- 42) loc. cit. 40) S.204.
- 43) R.E.Knowles u. A.L.Livingstone, J. Chromatogr. 61, 133 (1971).
- 44) K.Randerath in "Dünnschicht-Chromatographie", S. 151, Verlag Chemie, Weinheim (1962).
- 45) loc. cit. 40) S. 203.
- 46) Z.Šesták, Chromatographic Rev. 7, 65 (1965).
- 47) L.R.G.Valadon u. R.S.Mummery, Phytochem. 11, 413 (1971).
- 48) J.Sherma, J. Chromatogr. 61, 202 (1971).
- 49) R.F.Taylor u. M.Ikawa, Anal. Biochem. 44, 623 (1971).
- 50) R.F.Taylor u. B.H.Davis, J. Chromatogr. 103, 327 (1975).
- 51) A.J.P.Martin u. L.R.M.Synge, Biochem. J. 35, 1358 (1941).

- 52) G.Deininger u. I.Halász, J. Chromatogr. 60, 65 (1971).
- 53) E.H.Pfadenhauer, T.E.Lynes u. T.V.Updyke, Anal. Chem. 46, 623 (1974).
- 54) I.Halász, A.Kroneisen, H.O.Gerlach u. P.Walkling, Z. anal. Chem. 234, 81 (1968).
- 55) D.Randau u. W.Schnell, J. Chromatogr. 57, 373 (1971).
- 56) J.J.Kirkland, J. Chromatogr. Sci. 10, 129 (1972).
- 57) J.J.Kirkland, J. Chromatogr. Sci. 9, 206 (1971).
- 58) W.Strubert, Chromatographia 6, 50 (1973).
- 59) R.B.Griffith u. C.R.Thompson, Bot. Gaz. 111, 165 (1949).
- 60) loc. cit. 40) S.200.
- 61) N.K.Boardman u. J.M.Anderson, Biochim. Biophys. Acta 143, 187 (1967).
- 62) loc. cit. 19) S.290.
- 63) loc. cit. 30) S.507.
- 64) F.H.Foppen, Chromatographic Rev. 14, 133 (1971).
- 65) loc. cit. 30) S. 529.
- 66) A.Hager u. T.Meyer-Bertenrath, Planta (Berl.) 76, 149 (1967).
- 67) A.Hager u. T.Meyer-Bertenrath, Ber. Dtsch. Bot. Ges. 80, 426 (1967).
- 68) loc. cit. 37) S.68.
- 69) W.Eichenberger u. E.C.Grob, Helv. Chim. Acta 45, 974 (1962).
- 70) J.P.Sweeney u. A.C.Marsh, J. Assoc. off. anal. Chemists 53, 937 (1970).
- 71) I.Stewart u. T.A.Wheaton, J. Chromatogr. 55, 325 (1971).

- 72) M.Vecchi, J.Vesely u. G.Osterhelt, J. Chromatogr. 83, 447 (1973).
- 73) H.Engelhardt in "Hochdruck-Flüssigkeits-Chromatographie", S. 100, Springer-Verlag, Berlin (1975).
- 74) I.Halász u. J.Sebastian, Angew. Chem. 81, 464 (1969).
- 75) J.B.Wilkes, Ind. Eng. Chem., Anal. Ed. 18, 702 (1946).
- 76) J.M.Kolthoff, J.Shapiro, J. Amer. Chem. Soc. 72, 776 (1950).
- 77) J.Bohemen, S.H.Langer, R.H.Perret u. J.H.Purnell, J. Chem. Soc., London, 1960, 2444.
- 78) K.Karch, Dissertationsarbeit an der Math. Nat. Fak. der Universität d. Saarlandes, S. 13 (1974).
- 79) J.J.Kirkland in "Modern Practice of Liquid Chromatography" Wiley, New York (1971).
- 80) J.W.Porter u. R.E.Lincoln, Arch. Biochem. 27, 390 (1950).
- 81) loc. cit. 68) S. 121.
- 82) J.J.Jen, J. Agr. Food Chem. 22, 908 (1974).
- 83) loc. cit. 66) S. 152.
- 84) O.Isler u. P.Schudel in "Carotine und Carotinoide" (Wiss. Veröff. d. Dtsch. Ges. f. Ernährung) 9, 54 (1963).
- 85) loc. cit. 68) S. 138.
- 86) G.Schomburg u. K.Zegarski, J. Chromatogr. 114, 174 (1975).
- 87) loc. cit. 64) S. 168.
- 88) L.Cholnoky, C.Györgyfy, E.Nagy u. M.Páncél, Nature 176, 410 (1956).
- 89) loc. cit. 71) S. 328.

- 90) loc. cit. 40) S. 205.
- 91) loc. cit. 30) S. 507.
- 92) T.R.Parsons, J. Fisheries Res. Board Canada 18,
1017 (1961).
- 93) D.J.Chapman, Phytochem. 5, 1331 (1966).
- 94) H.H.Strain, Leaf Xanthophylls, Washington, Carnegie
Institution (1938).
- 95) loc. cit. 30) S. 518.
- 96) A.K.Stobart, I.McLaren u. T.R.Thomas, Phytochem. 6,
1467 (1967).
- 97) loc. cit. 8) S. 41.
- 98) L.R.G.Valadon u. R.S.Mummary, Phytochem. 6, 983 (1967).
- 99) A.Baccarini, F.Bertossi u. N.Bagni, Phytochem. 4,
349 (1965).
- 100) loc. cit. 20) S. 684.
- 101) K.Egger, Ber. Dtsch. Bot. Ges. 77, 145 (1964).
- 102) W.Eichenberger u. E.C.Grob, Helv. Chim. Acta 45,
1556 (1962).
- 103) P.Karrer u. O.Walker, Helv. Chim. Acta 17, 43 (1934).
- 104) E.C.Grob, W.Eichenberger u. R.P.Pflugshaupt, Chimia
15, 565 (1961).
- 105) A.Hager, Planta (Berl.) 48, 592 (1957).
- 106) N.J.Krinsky u. T.H.Goldsmith, Arch. Biochem. 91,
271 (1960).
- 107) F.B.Jungalwala u. H.R.Cama, Biochem. J. 85, 1 (1962).
- 108) L.Cholnoky, J.Szabolcs u. E.Nagy, Liebigs Ann. Chem.
616, 207 (1958).

- 109) L.Cholnoky, K.Györgyfy, E.Nagy u. M.Pánczél, Acta Chim. Acad. Sci. Hung. 6, 143 (1955).
- 110) K.Egger, Ber. Dtsch. Bot. Ges. 81, 153 (1968).
- 111) T.Hiyama, M.Nishimura u. B.Chance, Anal. Biochem. 29, 339 (1969).
- 112) M.S.Barber, L.M.Jackman, C.K.Warren u. B.C.L.Weedon, J. Chem. Soc., London, 1961, 4019.
- 113) H.Pauschmann u. E.Bayer in "Methodicum Chemicum" Bd.1, S. 148, Georg Thieme-Verlag, Stuttgart (1973).
- 114) H.Brockmann u. O.Völker, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 224, 193 (1934).
- 115) E.M.Bickoff, Methods of Biochem. Anal. 4, 1 (1971).
- 116) Z. Lebensm.-Unters. u. Forsch., (Ges. u. VO) 130, 118 (1966).
- 117) O.Isler, R.Rüegg u. P.Schudel, Chimia 15, 208 (1961).
- 118) I.Wildfeuer, L.Acker, A.Mehner u. W.Rauch, Z. Lebensm.-Unters. u. Forsch. 136, 203 (1968).
- 119) loc.cit. 6) S. 1081.
- 120) V.Schurig, Angew. Chem. 88, 336 (1976).

Lebenslauf

Klaus L a n g e r

Geboren: 7.12.1946 in Steinenhausen bei
Kulmbach/Bayern

Eltern: Robert Langer, Brauereidirektor und
Walburga Langer, geb. Föger

Volksschule: 1953 - 1957 in Kulmbach/Ofr.

Höhere Schule: 1957 - 1966 Oberrealschule in Kulmbach
Reifezeugnis dieser Schule vom 19.7.1966

Bundeswehr: 1966 - 1968 18-monatiger Grundwehr-
dienst

Studienbeginn: Sommersemester 1968 an der Friedrich-
Alexander-Universität Erlangen - Nürnberg

Diplom-Chemiker-
Vorprüfung: Mai 1970

Diplom-Chemiker-
Hauptprüfung: November 1972

Diplomarbeit: Dezember 1972 - Oktober 1973
seit Dezember 1973 Verwalter einer
wissenschaftlichen Assistentenstelle
am Institut für Organische Chemie I
der Universität Erlangen - Nürnberg

Offsetdruck-Fotodruck

J. Hög, 8520 Erlangen, Hauptstr. 109 (Nähe Martin-Luther-Platz) Tel. 22990